

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Marju Bani

**Rahutute jalgade sündroomi
patofüsioloogiast ja geneetilistest aspektidest**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad

Maris Teder-Laving M.Sc ja

Andres Metspalu M.D Ph D

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Sündroomi olemus	5
1.2 RLS-i klassifikatsioon	8
1.3 RLS diagnostika	8
1.3.1 Diagnostilised kriteeriumid	8
1.3.2 Uneuuringud	9
1.4 RLS ravi	10
1.5 Patofüsioloogia	13
1.5.1 Dopamiin	13
1.5.2 Glutamaat	16
1.5.3 Türeoidhormoon	16
1.6 RLS-i põhjused	18
1.6.1 Sekundaarse RLS-i põhjused	18
1.6.1.1 Haigused	18
1.6.2 Primaarse RLS-i põhjused	20
1.6.2.1 Medikamendid	20
1.6.2.2 Rasedus	20
1.6.2.3 Geneetika	20
1.6.2.3.1 Hinnangud geneetilise komponendi osatähtsusele RLS väljakujunemisel ...	20
1.6.2.3.2 Kaksikuteuuringud	21
1.6.2.3.3 RLS-I pärilikkusmustrid	22
1.6.2.3.4 Aheldusuuringud	23
1.6.2.3.4.1 RLS1	23
1.6.2.3.4.2 RLS2	23
1.6.2.3.4.3 RLS3	24
1.6.2.3.4.4 RLS4	24
1.6.2.3.4.5 RLS5	25
1.6.2.3.4.6 RLS6 ja RLS7	25

1.6.2.3.5 Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS, <i>Genome-wide association-study</i>) ja uuringud mudelorganismidega	25
1.6.2.3.5.1 <i>BTBD9</i>	26
1.6.2.3.5.2 <i>MEIS1</i>	29
1.6.2.3.5.3 <i>PTPRD</i>	31
1.6.2.3.5.4 <i>MAP2K5/SKOR1</i>	31
1.6.2.3.5.5 <i>TOX3</i>	32
1.6.2.3.6 Eksoomi sekveneermise uuring	33
1.7 Tuleviku uurimissuunad	34
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	39
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	53
LISAD	55
Lisa 1.	55
Lisa 2.	56
LIHTLITSENTS	61

KASUTATUD LÜHENDID

GABA- gamma aminovõihape ehk *gamma-aminobutyric acid*

GWAS- Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring ehk *Genome-Wide Association Study*

CYP450- tsütokroom P450 ehk *cytochrome P450*

DZ-disügootne ehk *dizygotic*

EMG- elektromüograafia ehk *electromyography*

L-dopa- levodopa ehk *3,4-dihydroxyphenylalanine*

LOD-LOD skoor ehk *logarithm of odds*

MZ-monosügootne ehk *monozygotic*

MRI- magnetresonantstomograafia ehk *magnetic resonance imaging*

OR-šansside suhe ehk *odds ratio*

PLM- perioodiline jäsemete liigutamine ehk *periodic limb movements*

PLMD- perioodiline jäsemete liigutamise häire ehk *periodic limb movement disorder*

PLMS- perioodiline jäsemete liigutamine une ajal ehk *periodic limb movements in sleep*

RLS- rahutute jalgade sündroom ehk *restless legs syndrome*

RR- relatiivne risk ehk *risk ratio*

RT-PCR - reaalaaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ehk *real-time polymerase chain reaction*

SNP- ühenukleotiidne polümorfism ehk *single-nucleotide polymorphism*

T3- türoksiin ehk *thyroxine*

T4- trijoodtüroniin ehk *triiodothyronine*

TH kilpnäärmehormoon ehk *thyroid hormone*

TSH- kilpnääret stimuleeriv hormoon ehk *thyroid-stimulating hormone*

SISSEJUHATUS

Rahutute jalgade sündroom (RLS, *restless legs syndrome*) on haigus, mis väljendub vastupandamatu vajadusena liigutada oma jäsemeid. See häire on ebameeldiv ja ei lase inimesel õhtul uinuda. Lisaks kaasub sellega sageli perioodiline jäsemete liigutamise häire (PLMD, *periodic limb movement disorder*), mis ei lase öösel korralikult välja puhata. RLS on üks levinumaid neuroloogilisi haigusi valge rassi hulgas. RLS perekondade aheldusuuringud viitavad vähemalt seitsmele erinevale kromosoomipiirkonnale, millel võiks olla põhjuslik seos selle patoloogia väljakujunemisega. Ka ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud on osutunud suhteliselt edukateks, tuues välja mitmete SNP-de (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) riskialleelid, mille omamine viitab geneetilisele eelsoodumusele RLS-i haigestumisel. Siiski, põhjuslike seoste selgitamiseks leitud genoomipiirkondade ja RLS-i vahel on vaja nii täiendavaid geneetilisi kui ka funktsionaalseid uuringuid.

Käesoleva töö eesmärgiks on anda kirjanduses avaldatud materjalide abil ülevaade RLS-i kliinilisest olemusest ja patofüsioloogiast ning põhjalikumalt käsitleda viimaste aastate geneetilistes uuringutes avastatud kandidaatgeene ja arvatavalt põhjuslikult seotud riskialleele erinevates genoomipiirkondades.

Märksõnad: RLS, SNP, PLM, PLMD, polüsomnograaf

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Sündroomi olemus

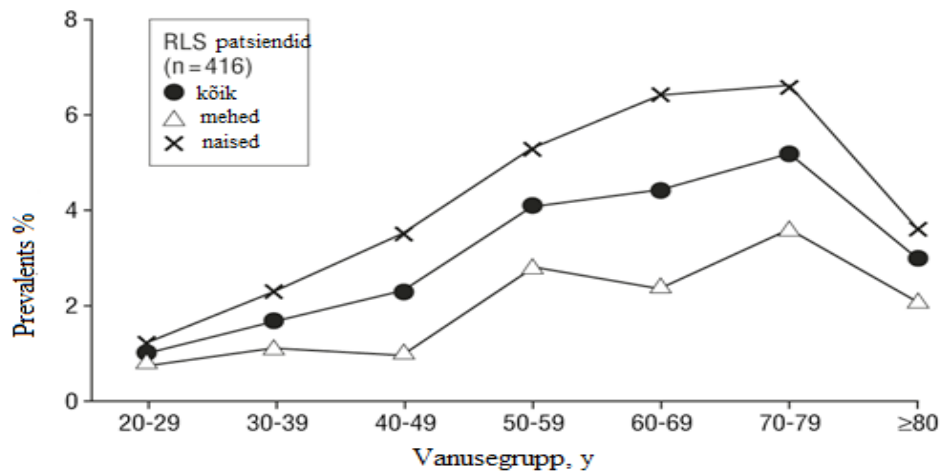
RLS ehk Willis Ekbomi sündroom on neuroloogiline haigus, mida iseloomustab vastupandamatu tung ennast liigutada, et leevendada oma kehas tekkinud ebamugavustunnet (Christopher ja Earley, 2003). Kõige esimesena kirjeldas Thomas Willis RLS-i sümptomeid. Kirjutatud ladina keeles, pärineb see uuring 1672. aastast ja on üks vanimaid haiguse kirjeldusi unemeditsiini ajaloos (Willis, 1672). RLS-i geneetika ulatub aastasse 1923, kui saksa neuroloog Hermann Oppenheim kirjeldas esimest korda RLS-i kui pärilikku haigust oma õpikus: "*Text-book of Nerve Disorders*". Tema õpik oli oluline, kuna esimest korda toodi välja, et RLS võib kanduda ühelt pereliikmelt teisele (Oppenheim, 1923). Esimene tänapäevane kirjeldus RLS sündroomist pärineb 1945. aastast rootsi neuroloogilt Ekbomilt (Ekbom, 1960).

Tema leidis, et 1/3 kõigist RLS juhtumitest on pärilikud ja kirjeldas perekondi, kellel oli autosoom-dominantne pärandumismuster (Ekbom, 1945).

Tavaliselt hõlmab ebamugavustunne jalgu, kuid võib haarata ka käed ja keha (Skidmore et al., 2009). Liigutamine annab patsiendile ajutist leevendust. Iseloomulikku ebameeldivustunnet on kirjeldatud erinevalt: kihelemine, mida pole võimalik sügamisega leevendada, tõmblemine ning valu. Haiguse sümptomid algavad või intensiivistuvad tavaliselt rahuolekus ja tüüpiliselt enne magamajäämist (Allen et al., 2003).

RLS prevalents Aafrikas on 0,01%, Aasias 0.7% kuni 12.5%, Ameerikas 2.0% kuni 18.9% ja Euroopas 3.2% kuni 18.3%. RLS-i leviku kaardistamine riigiti või piirkonniti nii Põhja- ja Lõuna-Ameerikas kui ka Euroopas näitab RLS-i sageduse kasvu suurematel põhjalaiustel. RLS-i levimus on positiivses korrelatsioonis põhjalaiusega nii Põhja-Ameerikas kui ka Euroopas, kusjuures korrelatsioonikordajad on vastavalt $r=0,77$ ($p=0,02$) ja $r=0,74$ ($p=0,0002$). Euroopas, madalama laiuskraadidega riikides, nagu Kreeka ja Türgi, on RLS-i levimus (1000 elaniku kohta) vastavalt 38 ja 34, keskmisel laiusel asetsevates riikides, nagu Prantsusmaa ja Inglismaa, vastavalt 108 ja 86 ning suurema põhjalaiusega riikides, nagu Norra ja Island, vastavalt 143 ja 183 (Koo, 2012). Arvatakse, et põhjuseks võib olla mõnede selliste haiguste sageduse tõus, millel on seos sekundaarse RLS-i tekkimisega. Näiteks sclerosis multiplex, mis tekitab sekundaarset RLS-i ja mida on kõrgematel laiuskraadidel rohkem kui madalamatel (Norman et al., 1983). Samuti levib külmas kliimas Epstein-Barri viirus, millega nakatunudel tõuseb sclerosis multiplexi tekkerisk tugevalt (Levin et al., 2010). Kliiniliselt olulise RLS-i prevalents valge rassi hulgas on keskmiselt 2,7%. (Uuringud viidi läbi USA-s, Prantsusmaal, Hispaanias, Itaalias, Saksamaal ja Suurbritannias.) Kliiniliselt oluline RLS-i prevalents on RLS-i protsent teatud populatsioonis, mille puhul haigussümptomid on piisavalt tõsised, et vajaksid ravi (Allen et al., 2005).

RLS-i prevalents naiste hulgas on peaaegu kaks korda suurem kui sama vanusegrupi meeste hulgas (9,0% naistel ja 5,4% meestel). RLS haigestunute arv populatsioonis tõuseb kuni vanuseni 79. eluaastat ja seejärel hakkab langema (joonis 1.) (Allen et al., 2005).



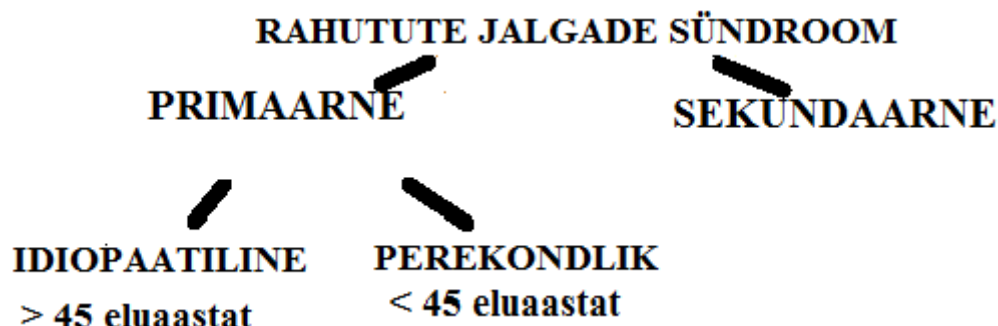
Joonis 1. RLS prevalents eri vanusegruppides meeste ja naiste hulgas (Allen et al., 2005, muudatustega).

Tegu on haigusega, mille raskusaste varieerub laias spektris. Mõnedel inimestel avaldub RLS vaid väheste ebamugavusena enne magama jäämist, teistel põhjustab aga tõsisid unehäireid ning halvendab oluliselt elukvaliteeti, kuna RLS-iga kaasneb tihti PLMD (Earley ja Silber, 2010) ja RLS suurendab ka kardiovaskulaarhaiguste riski (Schlesinger et al., 2009).

RLS-iga esineb samaaegselt tihti PLMD, mis esineb magamise ajal ja põhjustab unehäireid. RLS-i saab patsiendil diagnoosida diagnostiliste kriteeriumite alusel aga PLMD diagnoosimiseks on vaja teha polüsomnograafiline uuring. Seega RLS esineb ärkvelolekul ja ei lase inimesel magada või esineb öösel ja samuti hoiab inimese ärkvel, siin on tegu tahtlike liigutustega, et ebamugavustunne jäsemes kaoks. PLMD poolt põhjustatud perioodiline jäsemete liigutamine (PLM, *periodic limb movement*) esineb öösel nii, et inimene ei ärkagi üles, vaid läbi une liigutab jäsmeid. (Rijsman ja De Weerd, 1999) Perioodiline jäsemete liigutamine uneajal (PLMS, *periodic limb movements in sleep*) on peamiselt polüsomnograafiaga diagnoositud häire aga PLMD on juba kliiniline sündroom. Mitte kõik inimesed, kellel on PLMS ei saa diagnoosiks PLMD-d (Montplaisir et al., 1997). Samas mitte kõik patsiendid, kellel on PLMS, ei pruugi põdeda RLS-i. PLMS on toetav diagnostiline kriteerium RLS-ile täiskasvanutel ja tähtis kriteerium RLS-i põdevatel lastel (R P Allen et al., 2002). PLMD ravis kasutatakse samu ravimeid, mida RLS-i puhul, eriti sellisel juhul kui PLMD kaasub RLS-iga. Haige, kellel kahtlustatakse PLMD-d vajab polüsomnograafilist uuringut juhul, kui on tõendeid unekatkestustele või päevasele väsimusele (Hening et al., 2004).

1.2 RLS klassifikatsioon

RLS jaotatakse primaarseks ja sekundaarseks RLS-iks. Sekundaarne RLS tekib teiste haiguste foonil. Primaarne RLS jaguneb omakorda perekondlikuks RLS-iks ja idiopaatiliseks RLS-iks (joonis 2.) (Schulte ja Winkelmann, 2014). Perekondlikku RLS-i iseloomustab sage perekondlik eelsoodumus, haiguse varajane algus ja haiguse aeglane progresseerumine. Idiopaatiline RLS on hilisema algusega ja kiirema arenguga (Clardy ja Connor, 2009).



Joonis 2. Rahutute jalgade sündroomi jaotus (Clardy ja Connor, 2009, muudatustega).

1.3 RLS diagnostika

Tavaline kliiniline läbivaatus ja raua taseme määramine (seerumi ferritiini tase < 50 ng/ml) on vajalikud RLS-i esmaseks diagnoosimiseks. Kui diagnoos on kaheldav, tuleks teha polüsomnograafiline une salvestus, et hinnata PLMS-i või tuleks läbi viia terapeutiline uuring dopamiinergilise ainega. Sõltuvalt kliinilisest kontekstist, võib läbi viia teised bioloogilised uuringud ja elektromüograafia (EMG, *electromyography*), et kitsendada diferentsiaalset diagnoosi või selgitada välja kaasuvad haigused (Dauvilliers ja Winkelmann, 2013).

1.3.1 Diagnostilised kriteeriumid. Kriteeriumid RLS-i diagnoosimiseks on esmakordselt esitatud Rahvusvahelise Rahutute Jalgade Sündroomi Uurimisrühma poolt 2003. aastal ja täiendatud 2012 (URL: <http://irlssg.org/diagnostic-criteria/>).

1. Vajadus liigutada jalgu, kuna tuntakse ebamugavustunnet jalgades. Mõnikord on vajadus liigutada jalgu ainus sümptom ja ebamugavustunnet jalgades ei esine ning mõnikord on lisaks jalgadele sümptomid ka kätes või teistes kehaosades.

2. Vajadus liigutada jalgu kuna ebamugavustunne jalgades läheb suuremaks puhkehetkedel või istudes ja lamades.
3. Vajadus liigutada jalgu ja ebamugavustunne kaovad või leevenduvad kõndimisel või jalgade sirutamisel.
4. Tung liigutada jalgu ja sellega kaasnev ebameeldiv tunne esineb tugevamini puhkamise või tegevusetuse ajal ning on tugevam öhtul või öösel kui päeval. Sellegipoolest esinevad sümptomid kogu päeva jooksul, ainult madalama tugevuseastmega.

Diagnostilisi kriteeriume toetavad:

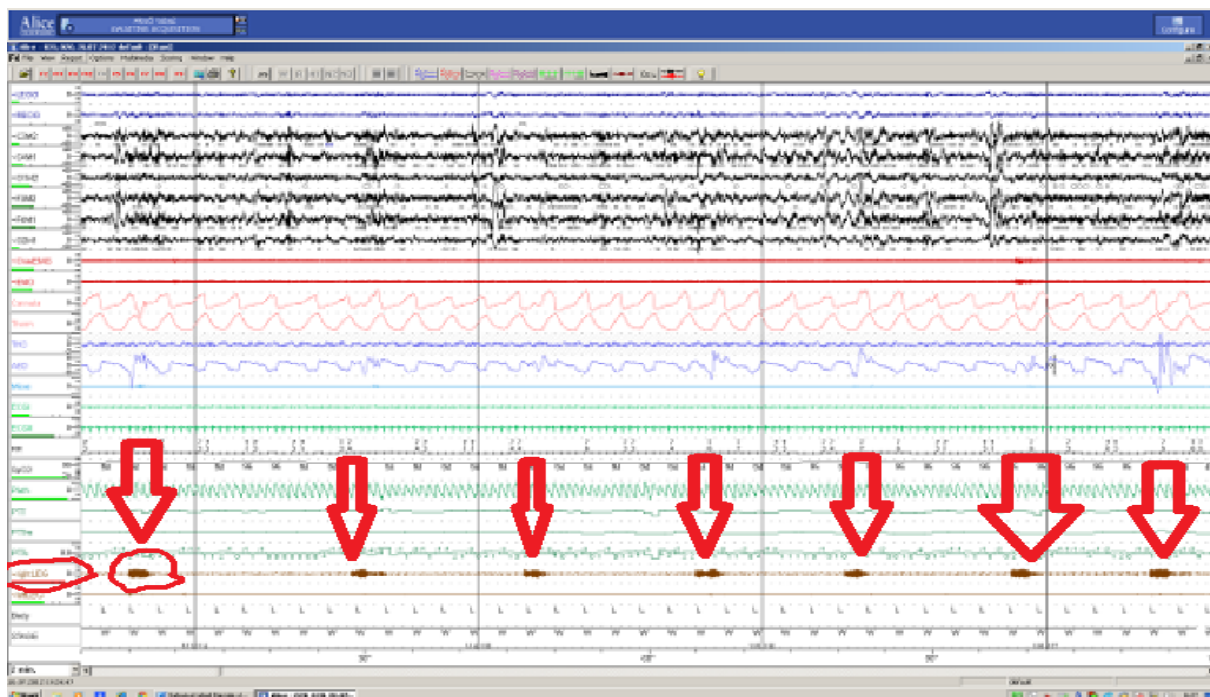
- 1) Perekondlik RLS (Allen et al., 2003).
- 2) Sümptomid vähenevad tänu dopamiinergilistele ravimitele.
- 3) PLM magamise ajal on registreeritud polüsomnograafilise uuringuga või teiste jäsemete aktiivsust mõõtvate seadmetega. PLMD kaasneb 85% RLS haigetest (Allen et al., 2003).

1.3.2 Uneuuringud

Uuringud unekliinikutes viiakse läbi, kasutades selleks polüsomnograafi või elektroonset aktigraafi (Gschliesser et al., 2009).

Polüsomnograaf on aparaat, mis registreerib uneajal samaaegselt aju lainesagedusi, silmade liigutusi, südametööd, norskamist, kehaasendit, pulssi, rindkere ja diafragma liikuvust, nina- ja suuhingamissagedust, lihastoonust erinevates lihastes ja ka lihastoonust jalgades (elektroodidega *m.tibialistel*) (joonis 3.) (Billiard, 2003a).

Aktigraaf jälgib liikumist ja selle abil saab hinnata une-ärkveloleku tsüklit või tsirkadiaanseid rütme pikema aja jooksul. See kasutab aktseleromeetrit (kiirendusandur) liikumise salvestamiseks. Seda informatsiooni kasutatakse seejärel graafiku loomiseks. Aktiivsed ajad moodustavad graafikul tipu, samas kui vaikset aega, nagu uni, esindab lame joon. Aktigraafi võib kanda mitu nädalat või isegi mitu kuud. Üldiselt võib see registreerida andmeid 24 tundi ööpäevas umbes kahe nädala jooksul. Tavaliste mudelitega saab teha mõõtmisi kuni 32 korda sekundis (URL: <http://sleepdisorders.about.com/od/sleepdisorderevaluation/a/What-Is-Actigraphy.htm>).



Joonis 3. RLS patsiendi polüsomnograafiline uuring. Joonisel on näha polüsomnograafi 2 minuti salvestus. Patsiendil on PLM tähistatud ringiga ja näidatud nooltega.

(Tartu Ülikooli Kliinikumi Psühhiaatriakliiniku Uneuuringute kabineti arvutiekraani fotopilt, 2013, muudatustega).

Jala liikumist defineeritakse kui EMG signaali suurenemist vähemalt üks neljandik amplituudist, mis on eksponeeritud biokalibratsiooni ajal, mis on kestusega pool kuni 10 s (Pollmächer ja Schulz, 1993). Et lugeda seda PLM-iks, peab liikumine esinema nelja või enama liigutuse rühmana, igaüks eraldatud rohkem kui 5 ja vähem kui 90 s (mõõdetud algusest alguseni). Et lugeda liigutused PLM-iks une ajal, peab liigutusele eelnema vähemalt 10 s und. Enamikes une keskustes ei loeta liigutust, mis on seotud hingamise katkestusega, PLM-iks. PLM indeks on PLM-ide arv, jagatud magatud tundidega. Ligikaudsed suunised PLM indeksi jaoks on (> 5 kuni <25 tunni kohta) kerge, (25 kuni <50 tunnis) mõõdukas ja (≥ 50 tunni kohta) raske (Geyer et al., 2010).

1.4 RLS ravi

Erinevaid ravivõimalusi saab näha joonisel nr. 4.

Teadaolevatest ravimitest on kõige efektiivsemad dopamiinergilised ravimid näiteks levodopa (L-dopa, *3,4-dihydroxyphenylalanine*), mille kõrvalmõjudeks on RLS-i esinemine päeval ja unetus öösi (Billiard, 2003b).

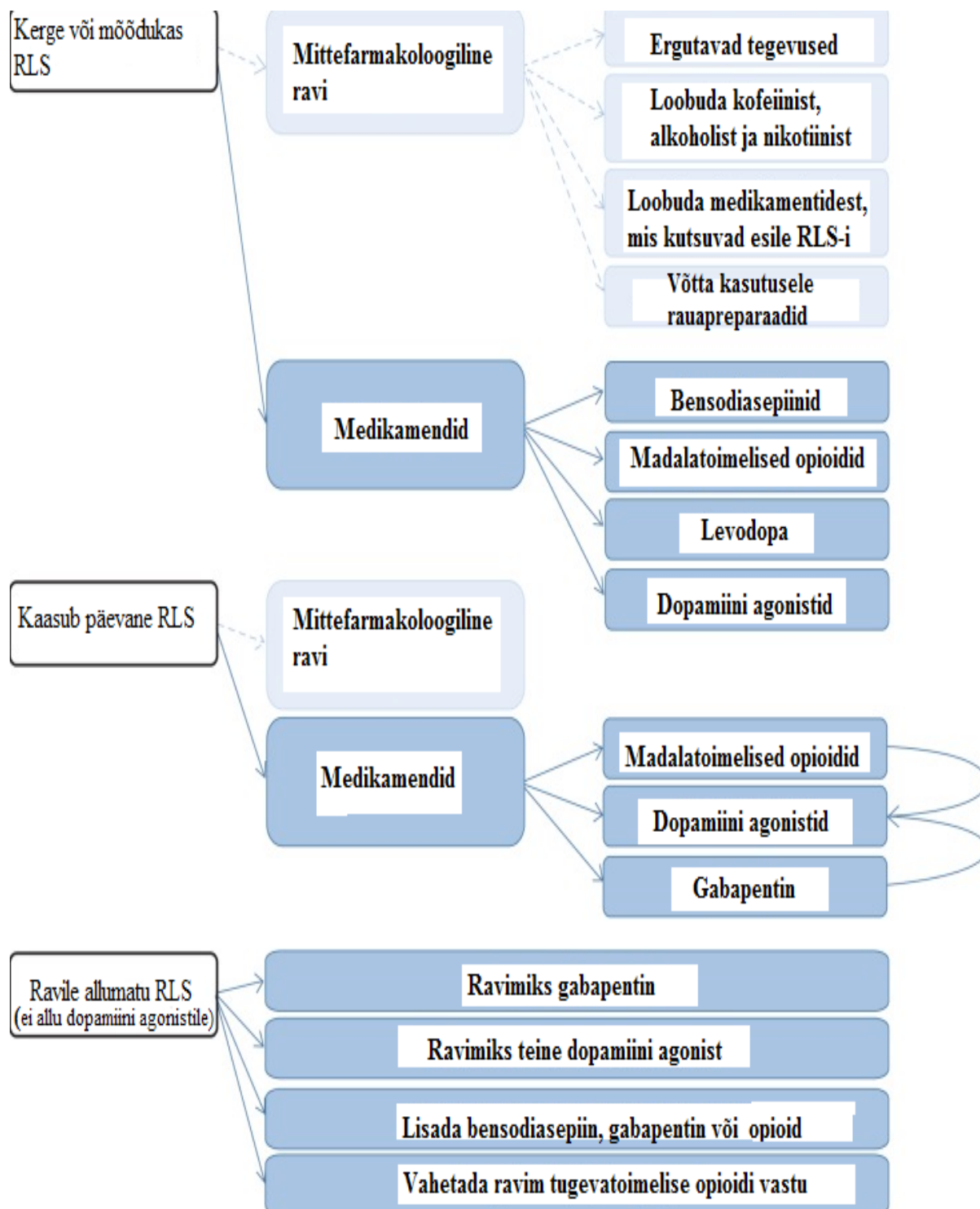
Dopamiinergilisi ravimeid tarvitavatel patsientidel, kellele lisada raviks rauapreparaate võib tekkida augmentatsioon (sümptomite ägenemine ravimi tarvitamisel). L-dopat põhjustab suurema tõenäosusega augmentatsiooni kui dopamiini agonistid (Trenkwalder ja Paulus, 2010). Dopamiini agonistideks on pramipeksool ja ropinirool (Billiard, 2003b). Pramipeksool (Mirapex) on retseptorite D2 ja D3 agonist (Winkelman et al., 2006). Kõrvaltoimeteks võivad olla iiveldus, peavalu ja väsimus (Ferini-Strambi, 2002). Madalatoimeliste opiaatide tarvitamisel võib tekkida tolerantsus ja sõltuvus ravimist (Billiard, 2003b).

Bensodiasepiine kasutatakse varem raviks kõige sagedamini aga paari kuuga võib tekkida tolerantsus. Kõrvalmõjudeks on erektsioonihäired ja uneapnoe ägenemine (Billiard, 2003b). Bensodiasepiinid põhjustavad kesknärvisüsteemi depressiooni, seondudes otse pärssiva neurotransmitteri gamma aminovõihape (GABA, *gamma-aminobutyric acid*) retseptoriga ja suurendades oma loomuliku ligandiga seostumise afiinsust. Tänu une paranemisele võib bensodiasepiini ravi vähendada ärkamiste arvu, mis on põhjustatud PLMS-ist (Mitler et al., 1986), kuid RLS-ga seotud liikumis- ja sensoorsete häiretest vabanemiseks võib selle efektiivsus olla väiksem (Silber et al., 2004).

Opioidid vähendavad neurotransmitterite vabanemist, millel on kesknärvisüsteemi valuvaigistav toime. Mõned uuringud on näidanud, et opioidide kasutamine, ka madalama toimega opioidide kasutamine, leevendab RLS-ga seotud paresteesiat või düsesteesiat, mootorset rahutust ja unehäireid (Silber et al., 2004).

Antileptilise ravimi **gabapentini** täpne toimemehhanism pole teada aga arvatakse, et ravimi sedatiivne ja sensoorne moduleeriv mõju RLS-ile aitab RLS-i sümptomeid pärssida (Trenkwalder et al., 2008).

Sekundaarse RLS-i puhul tuleb ravida sündroomiga seotud haiguseid (Trenkwalder ja Paulus, 2010) aga leevendatakse ka RLS-i sümptomeid. Intravenoosselt manustatud raudsahharoos on hästi talutav raualisand, mis vähendab erineval tasemel rauapuuduse all kannatavatel RLS-patsientidel RLS akuutse faasi sümptomeid (7 nädalat) (Grote et al., 2009). Kõrvaltoimeks on anafülaktiline reaktsioon (Earley et al., 2005). Rauapreparaatide intravenoosset manustamist peetakse piisavalt tõhusaks ainult RLS ravil sekundaarse kuni lõpp-staadiumi neeruhaiguse korral (Trenkwalder et al., 2008).



Joonis 4. Ravivõimalused erineva raskusastmega RLS-i puhul (Silber et al., 2004, muudatustega).

1.5 Patofüsioloogia

RLS on närvivõrgustiku häire paljudes närvisüsteemi piirkondades, alates perifeersest kuni ajukooreni, hõlmates struktuure, mis osalevad somatosensoorses tajus ning ka liikumise genereerimisel. See anatoomiline mitmekesisus kajastub paljudes erinevates topograafilistes geneetilistes ja biokeemilistes RLS-i põhjustes, kas eraldi või kombinatsioonis (Trenkwalder ja Paulus, 2010).

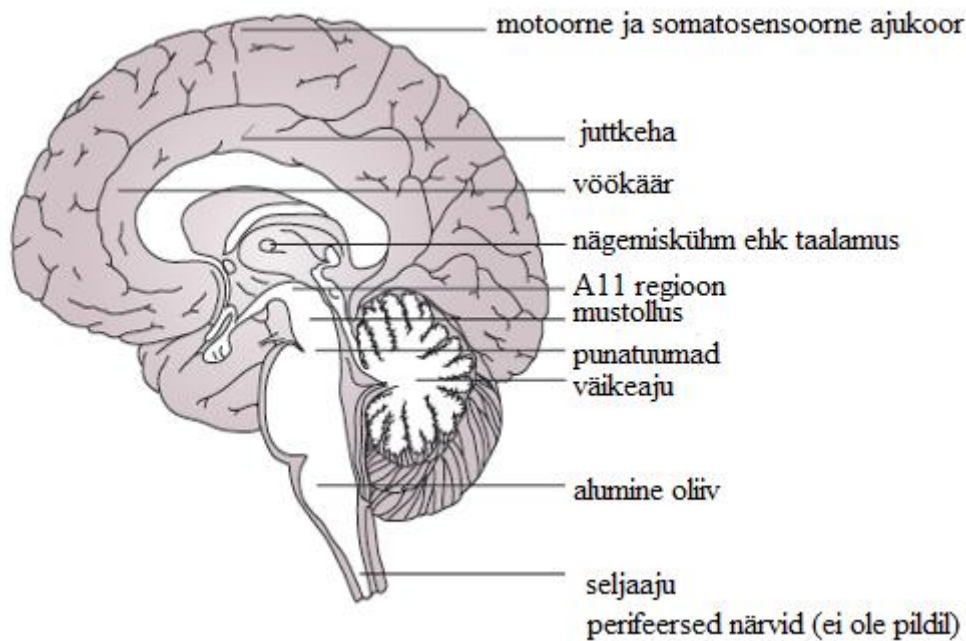
1.5.1 Dopamiin

On teada, et dopamiin ja L-dopa pärsivad RLS sümptomite avaldumist. Sellest on järeldatud, et RLS tekib siis, kui dopamiini tase organismis väheneb (Billiard, 2003c). Kuna ravis on olnud edukad dopamiinergilised ravimid, siis ka see viitab, et dopamiinergilisel neurotransmissiooni häirumisel on seos RLS-iga (Trenkwalder ja Paulus, 2010). Neuromodulaatorid nagu norepinefriin, dopamiin ja seriin ehk 5-hüdroksütrüptamiin moduleerivad spinaalsete motoneuronite erutatavust viiekordselt (Heckman et al., 2009). Dopamiin on äärmiselt tugevatoimelist efekti esiletoov, mistõttu piisab juba väikestest doosidest, et muuta efektid, mis on indutseeritud transkraniaalse stimulatsiooni poolt, erutatavatest efektidest inhibitoorseteks efektideks ja need efektid, mis on indutseeritud 5-hüdroksütrüptamiini poolt, inhibitoorsetest efektidest 5-kordset suuremat erutust esile kutsuvateks efektideks (Monte-Silva et al., 2009; Nitsche et al., 2009).

Dopamiin toimib läbi retseptorite. D1 ja D5 retseptorite stimulatsioon suurendab erutatavust aga samas D2, D3 ja D4 retseptorite stimulatsioon vähendab erutatavust. Esimese grupi retseptoreid seostatakse RLS augmentatsiooniga ehk sümptomite ägenemisega. Augmentatsioon on sündroom, mida iseloomustab väga tugevalt tõusnud dopamiini kontsentratsioon kesknärvisüsteemis. Kui dopamiini D1 retseptor on ülestimuleeritud võrreldes D2 retseptoriga seljaajus, siis võib tekkida valu jäsemetesse ja võib ka tekkida PLM. On leitud, et raua madal tase seerumis võib olla põhiline augmentatsiooni soodustav faktor (Paulus ja Trenkwalder, 2006).

Stimuleeritav ja inhibitoorne dopamiini retseptorite süsteem käitub erinevalt sõltuvalt sellest kas retseptorite stimulatsioon on pulseeriv või ühtlane. Sellest lähtuvalt võib korduv lühiajaline pulseeriv stimulatsioon põhjustada dopamiinergilises süsteemis teistsuguse reaktsiooni kui pikaajaline pidev stimulatsioon. Intratekaalne L-dopa võib supresseerida notsiseptiivseid stiimuleid aga need stiimulid suurenevad 2 h pärast uuesti.

Nendes mehhanismides osalevad D1 ja D2 retseptorid (Paalzow, 1992). Arvatakse, et lühiajaline RLS sümptomite paranemine tänu dopamiinergilisele ravimile, on vahendatud D2 ja D3 retseptorite poolt. Pidev pikaajaline stimulatsioon võib viia augmentatsioonini (sümptomite ägenemisele) kuna on pikaajaline tasakaalutus D1 retseptori aktiivsuses. See kehtib nii seljaaju kui ka kesknärvisüsteemi puhul (McNab et al., 2009).



Joonis 5. Närvisüsteemi regioonid, mis on seotud RLS-iga (Martin, J.H. (1996).

Neuroanatomy: Text and Atlas, 2nd ed., muudatustega).

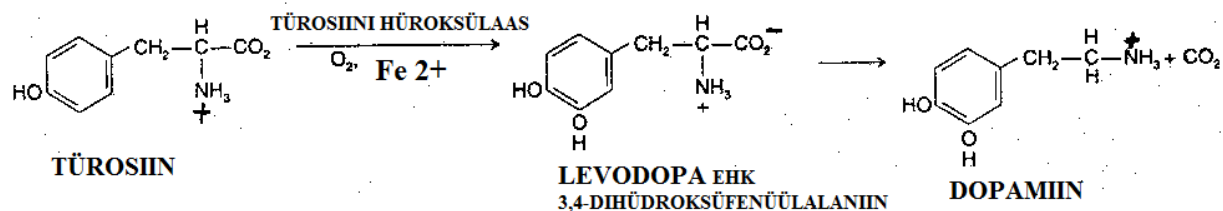
Need regioonid on avastatud magnetresonanstomograafias (MRI, *magnetic resonance imaging*), positronide emissiooni tomograafias, ultrahelis ja neuropatoloogias. Mõnede regioonide seotus RLS-iga on veel ebaselge. Üks selline regioon on motoorne korts. Need piirkonnad on RLS-iga assotsiatsiooniga kas põhjuslikult, epifenomenaalselt või kompensatoorselt (Trenkwalder ja Paulus, 2010).

Joonisel 5 on näha aju piirkonnad, mida seostatakse RLS-iga. MRI on näidanud, et bilateraalne aktivatsioon väikeajus, kontralateraalne aktivatsioon taalamuses ja aktiivsus punatumades ja ajupõhimikus leiab aset PLM-i ajal (Bucher et al., 1997). 2006. aasta uuring esitas tõendeid RLS haigetel üldise väiksema endogeense dopamiini taseme või suurenenud dopamiin D2 retseptorite olemasolu kohta basaalganglionides (Cervenka et al., 2006).

Varasem uuring näitas vähenenud dopamiin D2 retseptorite sidumist juttkehas (Turjanski et al., 1999). Neuropatoloogilistes uuringutes on avastatud RLS patsientide kudedes märgatav D2 retseptorite langus putamenis, ning see korreleerus RLS raskusastmega (Connor et al., 2009). RLS hiiremodelitel on A11 piirkonna rakud ainsad, mis reageerivad dopamiinergilisel innervatsioonil (Zhao et al., 2007). Punatuomad, alumine oliiv ja väikeaju tuumad võivad moodustada võrgu, mis võib summutada sensoorset informatsiooni liigutamise ajal. Selles kontekstis on väga oluline roll alumisel oliivil spinotserebellaarsetes ataksiates (Trenkwalder ja Paulus, 2004). Hüpererutatavus spinaalses motoorses süsteemis (Bara-Jimenez et al., 2000) ja spinaalses sensoorses juhtetees, kaasa arvatud valu traktis, võib samuti olla seotud RLS-iga (Trenkwalder ja Paulus, 2010). RLS patsiendid kogevad sügavat staatilist mehaanilist hüperalgeesiat aga mitte dünaamilist mehhaanilist hüperalgeesiat, kuigi mõlemad on iseloomulikud signaalidele, mis kutsuvad esile neuropaatilise valu (Stiasny-Kolster et al., 2004). Neuropaatiaga patsiendid võivad kogeda häirivaid RLS sümptome lisaks oma neuropaatia sümptomitele (Schattschneider et al., 2004).

RLS-i patofüsioloogias on oluline roll rauavähesusel ajus. RLS haigetel on ajus raua metabolism muutunud ning seljaaju vedelikus on näidatud vähenenud ferritiini taset (Earley et al., 2000). Aju rauavarude vähenemine viib muutustele dopamiinergilise süsteemi toimimises ja näidatud on tsirkadiaansete rütmide häirumist metaboliitidel (Allen ja Earley, 2007).

Raud on türosiin hüdroksülaasi kofaktor ja dopamiini süntees L-dopast toimub türosiin-hüdroksülaasi vahendusel (joonis 6.). Seega madal rauatase pärsib dopamiini sünteesi (Dauvilliers ja Winkelmann, 2013). Neuropatoloogilised uuringud näitavad, et RLS haigetel esineb raua taseme langus neuromelaniini tootvates rakkudes (Connor, 2008). Neuromelaniin on struktuurselt sarnane melaniiniga. Neuromelaniini ekspresseeritakse suures hulgas dopamiinergiliste rakkude poolt, mis asuvad aju mustaines (Fedorow et al., 2005).



Joonis 6. Dopamiini süntees

(URL: <http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd10.html>).

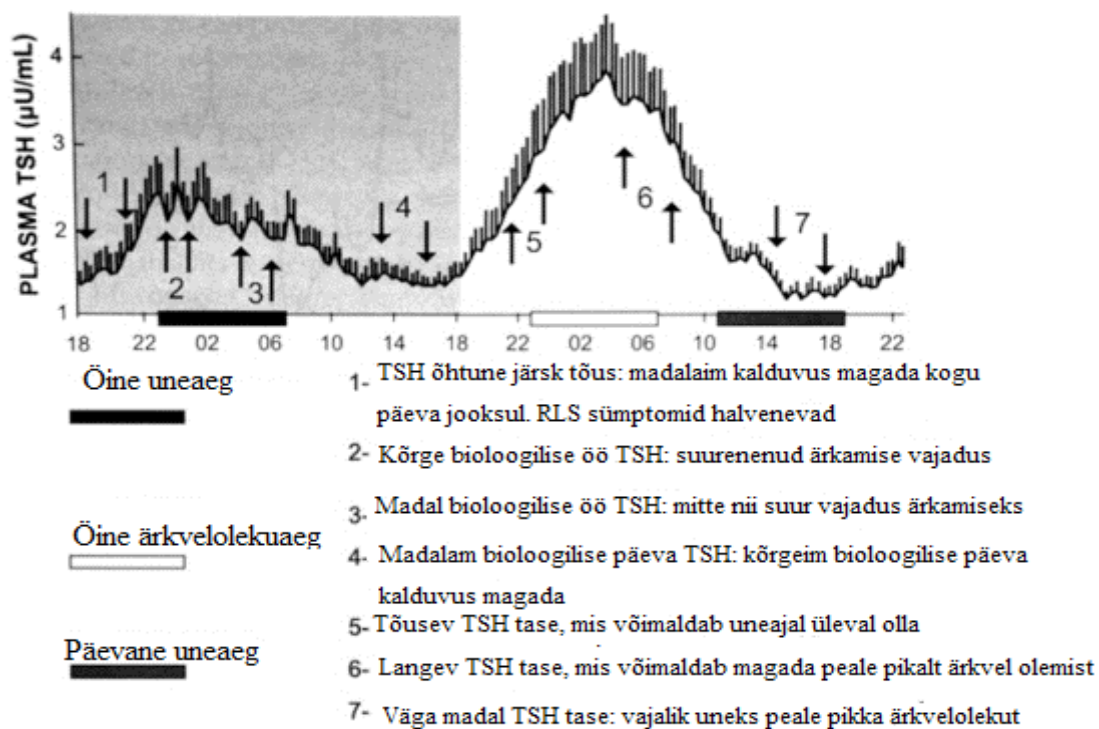
1.5.2 Glutamaat

Ward koos kolleegidega viis aastal 2007. läbi uuringu hindamaks glutamiini taset rottide ajus. Tiinuse- ja lakteerimisaegse toidu rauapuudus tõi kaasa raua vähenemise ajus ja striataalse glutamiini märkimisväärse suurenemise roti puhul (Ward et al., 2007). Connor kolleegidega leidis, et hiirtel, kellel oli H-ferritiini tase ajus madal, tekkisid RLS-iga sarnased sümptomid (Connor et al., 2003). Lisaks on tuvastatud hiire ventraalses keskajus seos raua sisalduse ja glutamiini transporterageeni (*GLT-1*) vahel. *GLT-1* ekspressioon näitas tugevat negatiivset korrelatsiooni ventraalse keskaju raua tasemega (Jellen et al., 2012). Sellest võib järeldada, et kui raua tase ajus on madal, siis *GLT-1* ekspressioon on indutseeritud ja glutamiini tase ajus tõuseb (Allen et al., 2013).

Need andmed annavad järjekindla mustri, mis näitab talaamilise glutamaatergilise aktiivsuse märkimisväärset suurenemist RLS patsientidel, mis võib tekitada liigvirgumist. Viimane põhjustab suurenenud ärkvelolekut uneajal, mõjutades enamasti mitte-REM-und ega ole seotud PLMS-ga. Dopamiin suudab kõrvaldada RLS-i klassikalised sümptomid aga õist liigvirgumist mitte. RLS-liigvirgumine võib samuti suurendada RLS-ga kroonilise unekao mõjusid päevasel ajal. Glutamaadi ja dopamiini homöostaasi muutused kesknärvisüsteemis võivad liituda ja olla vastasmõjus, tekitades arvukalt RLS-sümptomeid, st dopamiin on rohkem seotud sensoorsete sümptomidega ja PLMS-iga, glutamiin on rohkem seotud RLS-liigvirgumisega koos une häirimisega. Nende süsteemne suhteline kliiniline ja bioloogiline tähtsus ja vastastoime RLS-i puhul ja eeldatava RLS-liigvirgumise olulisus on veel kindlaks tegemata (Allen et al., 2013).

1.5.3 Türeoidhormoon

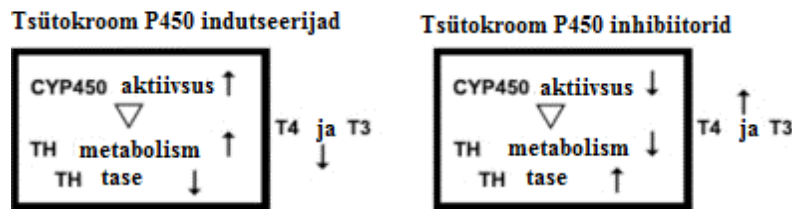
Oma osa RLS-i tekkel on leitud ka türeoidhormoonil (TH, *thyroid hormone*) ja türeoidstimuleerivate hormoonidel (TSH, *thyroid-stimulating hormone*). TSH-l on tsirkadiaanne rütm ja kontsentratsioon on madal päeval. Kontsentratsioon hakkab tõusma varastel õhtutundidel ja tõuseb enne une algust. Kõige kõrgem on TSH tase seerumis unealguse perioodil. Edasi hakkab TSH tase langema ja hommikuks jõuab tasemini, mis on omane päevasele tasemele (joonis 7) (Pereira et al., 2010).



Joonis 7. TSH taseme mõju unele ja unesoodumusele. Joonis kirjeldab suhet unesoodumusega TSH tasemete ja une vahel. Plasma TSH keskmine 24-tunnine profiil 53 tunni jooksul, sh 8 tundi ööund (must triiba), 28 tundi pidevat ärkvelolekut (öötunnid: valge riba) ja 8 tundi päevaund (must riba paremal). Objektideks olid noored terved mehed. Variala vastab 24-tunnistele normaaltingimustele (Pereira et al., 2010, muudatustega).

Dopamiin, kui ta on vähenenud, mängib olulist rolli RLS patofüsioloogias. Kui langeb dopamiini tase, on see põhjuseks RLS-i vaevustele, aga seda vaid juhul, kui pole kontrollitud rauasisaldust organismis. Kui võtta öhtuti dopamiini agonisti, siis sümptomeid ei esine. Dopamiin ja dopamiini agonistid inhibeerivad türeoidstimuleerivate hormoonide sekretsiooni. Oma osa on siin ka ensüümidel. Nimelt tsütokroom P450 (CYP450, *cytochrome P450*) on heemi ensüümid, seega nad sisaldavad rauda ning sama ensüüm degradeerib ka türeoidhormoone. Kui aga rauatase organismis on madal, siis ensüümi võime degradeerida türeoidhormooni kahaneb (Pereira et al., 2010).

Paljud ravimid, mis leevendavad RLS-i sümptomeid ja indutseerivad CYP450 aktiivsust, põhjustavad türeoidhormooni langust organismis (joonis 8.). RLS-i ravis kasutatakse näiteks ravimit carbamazepine, mis on nii induktor kui ka substants CYP450-le (Pereira et al., 2010).



Joonis 8. CYP450 indutseerijate ja TH ainevahetuse inhibiitorite mõjud ning nende türoksiin (T4, thyroxine) ja trijoodtüroniin (T3, triiodothyronine) tasemetega seotud farmakoloogiliste tegevuste lõpptulemused (Pereira et al., 2010, muudatustega).

1.6 RLS-i põhjused

1.6.1 Sekundaarse RLS-i põhjused

1.6.1.1 Haigused

Sekundaarne RLS tekib mitmete haiguste foonil (Trenkwalder ja Paulus, 2010).

Haigus võib areneda:

1. **Raua puudusel või megaloblastilise aneemia foonil.** Raud taastab dopamiinergilise ülekande aga rauapuudus pärsib seda, kuna rauapuudus aju mustaines kahjustab dopamiinergilisi retseptoreid (Pereira et al., 2010). Raua ainevahetuse häirega kaasnevad nii idiopaatiline kui ka sekundaarne sündroom. RLS puhul on ferritiin seerumis alla 50 µg/l (Trenkwalder ja Paulus, 2010).
2. **Diabeet-** RLS kaasneb väga tihti just diabeediga või diabeetilise neuropaatiaga (Müller-Felber et al., 1991). Teise tüübi diabeet on iseseisev riskifaktor RLS-i arengule (Merlino et al., 2007). Kui glükoosi on veres palju, siis see kahjustab väikseid veresooni, mis varustavad verega veresooni innerveerivaid närve. Kui need väiksed veresooned ummistuvad, siis närvid jalgades ja kätes kahjustuvad ning tekibki RLS ([URL: http://sleepdisorders.about.com/od/causesofsleepdisorder1/ss/RLS_Secondary_Causes_3.htm](http://sleepdisorders.about.com/od/causesofsleepdisorder1/ss/RLS_Secondary_Causes_3.htm)).
3. **Neerupuudulikkuse puhul-** RLS on tihti dialüüsi saavatel patsientidel. Siin võib rolli mängida aneemia, kuna erütropoetiini madal sisaldus vähendab RLS-i tõenäosust (Harris et al., 1991). Ühes uuringus leiti, et paratüreoidhormooni madal kontsentratsioon seerumis aga mitte seerumi hemoglobiin, on seotud RLS-iga. Selles uuringus leiti, et 136 dialüüsi patsientidel oli madal paratüreoidhormooni tase (Collado-Seidel et al., 1998). RLS-i sümptomid paranevad kui patsient teeb läbi neeru transplantatsiooni (Müller-Felber et al., 1991).

4. **Sclerosis multiplex-** Raud initsieerib müelinisatsiooni ja hüpomüelinisatsioon esineb rauapuudusel. Müelinisatsioonihäired esinevad Sclerosis multiplexi puhul ja indutseerivad RLS-i (Li, Y et al., 2012).
5. **Parkinsoni tõbi-** Nii RLS-il kui ka Parkinsoni tõve puhul on häired dopamiinergilise neurotransmitteri süsteemis, seega arvatakse, et siin on probleem dopamiini vähesel edasikandumisel (Garcia-Borreguero et al., 2003). Dopamiinergiline transmissioon on tõesti häiritud nende haiguste puhul, kuna raua kontsentratsioon aju mustaines on kõrge ja tekivad vabad radikaalid. Selle tulemusena hävivad dopamiinergilised rakud (Sun et al., 2011).
6. **Perifeerse neuropaatia puhul-** Täpset seost ei teata, aga arvatakse, et mutatsioonid geenides, mis põhjustavad perifeerset neuropaatiat võivad mõjutada kesknärvisüsteemi ja muuta kesknärvisüsteemis raua ja dopamiini kontsentratsiooni (Hattan et al., 2009). Kui perifeerne neuropaatia tekib tänu teise tüübi diabeedile, siis selle põhjust saab lugeda punkt number 4 all (Diabeet).
7. **Vaskulaarsed haigused-** Vaskulaarsed muutused või sümpaatilise närvisüsteemi hüperaktiivsus perifeerias või ajus viivad verevoolu vähenemisele. Sellest võib tuleneda kudede hüpoksia ja siit omakorda neuronaalne düsfunktsioon (Murray, 1967). Kui neurotransmissioon on häiritud, siis tekivad RLS-i sümptomid. Kardiovaskulaarsed haigused ja RLS-i põhjustavad mõlemad samade geenide mutatsioonid. Vaskulaarseid haigusi põhjustavad muutused järgmistes geenides: MEIS 1 ja LBX-COR1 ehk SKOR1 (Walters ja Rye, 2009).
8. **Krooniline obstruktiivne kopsuhaigus-** Haigust süvendab RLS. Õhuteede obstruktsioon, hüpoksia ja hüperkapnia esinevad rohkem patsientidel, kellel on diagnoositud RLS (Bryndis Benediktsdottir jt., 2012). Hüpoksiat indutseeriv faktor tõstab vaskulaarset endoteeli kasvufaktorit ja türosiini hüdroksülaasi. Mõlemad eelmainitud on tõusnud ka RLS patsientidel. Seega hüpoksia, mis esineb kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse puhul, aktiveerib samu juhteteid, mis on aktiveeritud RLS haigetel (Budhiraja et al., 2012).

1.6.2 Primaarse RLS-i põhjused

1.6.2.1 Medikamendid

- **Antiemeetikumid** (näiteks metoklopramiid) (URL:

http://www.ninds.nih.gov/disorders/restless_legs/detail_restless_legs.htm#261793237)

- blokeerib dopamiini retseptorid ajus (Alander et al., 1980).

- **Antipsühhootikumid** (URL:

http://www.ninds.nih.gov/disorders/restless_legs/detail_restless_legs.htm#261793237)

(näiteks kvetiapiin)(URL: [http://www.netdoctor.co.uk/brain-and-nervous-](http://www.netdoctor.co.uk/brain-and-nervous-system/medicines/seroquel.html)

[system/medicines/seroquel.html](http://www.netdoctor.co.uk/brain-and-nervous-system/medicines/seroquel.html))-blokeerib dopamiini retseptorid ajus (Seeman et al., 1975).

- **Antidepressandid** [serotoniini tagasihaarde inhibiitorid (URL:

http://www.ninds.nih.gov/disorders/restless_legs/detail_restless_legs.htm#261793237)

ja tritsüklilised anti-depressandid (URL:

http://www.rightdiagnosis.com/symptoms/restless_leg_syndrome/common.htm)]

serotoniinergiline neurotransmissioon ajutüves tekitab RLS-sümptomeid tänu

muutustele juttkeha dopamiinergilises neurotransmissiooni ja seljaaju

neuronite aktiivsuse muutusele (Jhoo et al., 2010).

1.6.2.2 Rasedus

RLS-i sümptomite suurenemisele aitab kaasa rasedus. Arvatakse, et selleks võivad olla: rauapuudus, foolhappe puudus, hormonaalsed muutused (Manconi et al., 2004). Samas on teada, et raseduse ajal on östradiool suurenenud ja see suurendab TH taset. Kui TH kontsentratsiooni suurenemine ei ole balansseeritud dopamiini süsteemi poolt, siis tekivad RLS-i sümptomid, sest kõrge TH kontsentratsioon tekitab RLS-i (Pereira et al., 2010).

1.6.2.3 Geneetika

1.6.2.3.1 Hinnangud geneetilise komponendi osatähtsusele RLS väljakujunemisel

Geneetilise komponendi olemasolule RLS patoloogia väljakujunemisel viitab RLS patsiendi sagedane positiivne perekonna anamnees ja haiguse suur konkordsus identsete kaksikute puhul.

Geneetiline eelsoodumus on eriti tugevalt väljendunud varasema algusega RLS-i puhul, mille korral rohkem kui 60%-l patsientidest on sama diagnoos esimese või teise järgu lähisugulastel. Xiong jt. (2010), uurides põhjalikumalt 249 RLS patsiendi perekondi Kanadas, leidsid, et 77%-l patsientidel eksisteeris nende perekonnas vähemalt ühel esimese sugulusastmega isikul RLS. Seejuures perekondlike juhtumite korral on suhteline risk õevenna haigestumisele 3.6 (95% usaldusintervalliga, 2.8-4.4) ja suhteline risk järeltulija haigestumisele 1.8 (1.0-2.7) (Xiong et al., 2010).

Ilmselt on pärilikkusekomponendil teatav osakaal ka hilisema algusega RLS-i ja sekundaarse RLS-i puhul aga arvatavalt oluliselt väiksem kui varase algusega RLS-i puhul (Dauvilliers ja Winkelmann, 2013).

1.6.2.3.2 Kaksikuteuuringud

Pärilikkusekomponendi osatähtsuse täpsemaks hindamiseks fenotüübilise tunnuse avaldumisel kasutatakse klassikaliselt kaksikuteuuringuid. Aastal 2004. viisid Desai ja tema kolleegid läbi küsitlustel põhineva kaksikuteuuringu. Uuriti naissoost kaksikutepaare. Monosügootseid (MZ, *monozygotic*) kaksikutepaare oli 911 ja disügootseid (DZ, *dizygotic*) 983. RLS sümptomite suhtes mittekonkordantseid MZ kaksikute paare ja konkordantseid MZ paare oli vastavalt 278 ja 215. RLS sümptomite suhtes mittekonkordantseid DZ kaksikute paare ja konkordantseid DZ paare oli vastavalt 390 ja 159. Konkordantsuse määraks saadi MZ kaksikutel 61% ja DZ kaksikutel 45%. Mõlema kaksiku haigestumise tõenäosus on MZ kaksikutel ligi poolteist korda suurem kui DZ kaksikutel ($RR = 1.4$, $p < 0.001$). RLS päritavuseks selle uuringu alusel saadi 52% (95% usaldusvahemik 36% to 68%) (Desai et al., 2004). Samas, saadud tulemus ei pruugi kehtida kogu populatsioonile, kuna uuriti vaid naissoost isikuid.

Aastal 2007. uurisid Xiong, Jang ja kaastöötajad 272 kaksikupaari: 140-st monosügootsest kaksikupaarist olid 11 RLS suhtes konkordantsed ja 19 paari diskordantsed. Samas 132-st disügootsest kaksikupaarist (71 naist / 14 meest / 47 naine-mees) olid ainult kaks RLS suhtes konkordantsed ning ülejäänud 22 paari olid diskordantsed. Nendest andmetest saadi konkordantsusnäitajateks RLS-i suhtes ühemuna- ja kahemunakaksikute puhul vastavalt 53,7% ja 15,4%. ning päritavuse määraks 69,4%. Nimetatud töös leiti kaksikutepaari siseselt ka kõrge korrelatsioon haigestumise algusajas ja sümptomite raskusastmes, mis veelgi suurendab geneetilise komponendi olulisust (Xiong et al., 2007).

1.6.2.3.3 RLS-i pärilikkusmustrid

RLS pärandumisviisi kindlakstegemiseks on uuritud paljusid suuri perekondi, milles on haigeid läbi mitme põlvkonna. Enamikus uuritud sugupuudest (90%) on haiguse ülekandumine vertikaalne ja pärilikkusmuster autosoom-dominantne, kuigi mõnes sugupuus on tegemist autosoom-retsessiivse pärandumismustriga ja 2,8 % peredest oli pärilikkus bilineaarne. See tähendab, et mõlemad vanemad olid RLS haiged või mõlema vanema suguvõsas oli RLS haigeid (Xiong et al., 2010).

Winkelmann jt näitasid RLS-perede komplekse segregatsioonianalüüsiga milles võeti arvesse patsientide keskmist vanust haiguse avaldumisel, et peredes, kus haigestutakse noores eas (alla 30a), esineb üks peamine geneetiline faktor, mis põhjustab RLS avaldumist autosoom-dominantse pärandumisviisiga. Pole selge, kas see võiks olla üks geenivariant ühes geenis, erinevad variandid ühes geenis või erinevad variandid erinevates geenides. Samas, kus haiguse algus on hilisem, ei leidnud nad tõendeid, mis viitaksid ühe olulise põhjusliku geeni olemasolule (Winkelmann et al., 2002). Järgnev segregatsioonianalüüs, mis hõlmas 590 fenotüpiseeritud subjekti 77-st RLS sugupuust, ei kinnitanud sellise ühe peamise geeni olemasolu, mis määratleks isiku vanuse haigestumisel ning autorite arvates tuleks RLS käsitleda kui komplekshaigust, millel tekkel on oluline osa mitte-geneetilistel põhjustel. (Mathias et al., 2006).

Tuleb arvestada fenokoopiate võimalikku esinemist peredes, kus esineb RLS (Winkelmann et al., 2002). See mõiste määratleb üksikisikuid, kellel on sarnane fenotüüp, mille määrajateks võivad olla erinevad geneetilised või keskkonnast tulenevad põhjused. Sageli võib täheldada fenokoopiate esinemist üldlevinud haiguste nagu RLS korral, ja neid võib käsitleda juhuslike sündmustena. Mõnedes RLS-peredes, kus haiguse edasikandumine oli ilmselgelt autosoom-dominantne, haigestunud isikute osakaal suurem kui oletatav 50%, mis viitab teatud juhtudel mittevastavusele Mendeli pärilikkusmehhanismile (Jiménez-jiménez et al., 2013). Püüdes anda vastuseid fenotüüpide olemasolu kohta RLS-peredes ja selgitada Mendeli pärilikkusmehhanismile mittevastavust selle haiguse geneetika puhul, esitas Zimprich hüpoteesi epigeneetiliste tegurite (geeniekspressiooni või rakulise fenotüübi pärilikud muutused, mille põhjustavad muud mehhanismid kui genoomi muutuse aluseks olevad DNA järjestuse muutused või funktsionaalselt olulised muutused, mis ei hõlma nukleotiidi järjestuse muutusi) võimaliku rolli kohta RLS pärilikkuse kohta (Zimprich, 2012).

1.6.2.3.4 Aheldusuuringud

Geneetilistes aheldusuuringutes püütakse identifitseerida selliseid genoomi füüsilisi segmente, mis on seotud antud tunnustega. Suurte RLS-perede kohta läbi viidud aheldusuuringutes on määratletud vähemalt seitse erinevat lookust, mis on seotud perekondliku RLS-ga, kuigi põhjuslikud geenid ei ole täpselt teada (Jiménez-jiménez et al., 2013).

1.6.2.3.4.1 RLS1 (kromosoom 12q12-q21) Esimest RLS-ga aheldunud lookuse kaardistamist kirjeldasid Desautels jt, kes viisid läbi ühe suure autosoom-retsessiivse prantsuse-kanada RLS-pere genoomiskaneerimise. Nad leidsid olulise ahelduse kromosoom 12q-s külgnevate mikrosatelliitmarkerite vahel, LOD-skooriga (LOD, *logarithm of odds*) väärtusel 3,42. Haplotüübi analüüs täpsustas geneetilist intervalli, positsioneerides RLS-soodustava geeni 14,71 cM alale D12S1044 ja D12S78 vahel (Desautels et al., 2001).

Winkelmann jt viisid läbi kolmeetapilise seoseuuringu (eksploratiivne uuring, replikatsiooni uuring, kõrgtihe polümorfismide kaardistamine) kahe valge rassi RLS haigusjuhtumite ja kontrollrühma seoseuuringu proovidega, kokku 918 isikut. Eksploratiivses uuringus (vastavalt 367 haigusjuhtumit ja kontrollisikut) skriiniti 366 geeni 1536 SNP-i 21 Mb piirkonnas, mis hõlmab RLS1 kriitilise piirkonna kromosoomis 12. Nad leidsid kolm olulist genoomset piirkonda ($p < 0,05$). Replikatsiooniuuringus (vastavalt 551 haigusjuhtumit ja kontrollisikut) genotüpiseeriti olulisemad SNP-d 1. etapist. Parim assotsiatsioon saadi SNP rs7977109, riskisuhtega (OR, *odds ratio*) (95 % usaldusvahemik [CI]) 0,76 (0,64–0,90) – see SNP paikneb neuronaaalse lämmastikoksiidi süntaasi (*NOS1*) geenis (Winkelmann et al., 2008).

1.6.2.3.4.2 RLS2 (kromosoom 14q13-q21) Bonati jt said olulisi tõendeid RLS aheldusest uue lookusega kromosoomi 14q13-21 piirkonnas, uurides 30-liikmelise itaalia perekonna kolme põlvkonda. See oli teine tuvastatud RLS lookus (RLS2) ja esimene, mis on ühetähenduslikult päranduv autosoom-domineeriva pärilikkusmustriga. Uus RLS kriitiline piirkond on markerite D14S70 ja D14S1068 vahel 9,1 cM pikkusel alal. Kahepunktilise LOD-skoori maksimaalne väärtus (3,23) saadi markeril D14S288 (Bonati et al., 2003).

Levchenko jt (Levchenko et al., 2004) said sellele lookuse seosele kinnitust Kanada prantslaste populatsiooniuringust ning Kemlink jt kirjeldasid 159 Euroopa RLS- trio (haigestunud patsient ja tema vanemad) perepõhise assotsiatsiooniuringu põhjal olulist seost haplotüübiga, mille moodustasid selle kromosoomi markerid D14S1014 ja D14S1017 (Kemlink et al., 2007). Teisalt aga ei leidnud Vogl jt Lõuna-Tirooli (Itaalia) elanikkonna seas läbi viidud uuringul mingeid aheldusi RLS2-ga (Vogl et al., 2006).

1.6.2.3.4.3 RLS3 (kromosoom 9p24-P22) Chen jt iseloomustasid 15 suurt ja laiendatud mitmekordsete sugulussidemetega sugupuud, mis koosneb 453 isikust (134 haigestunut RLS-i) ja tuvastasid kromosoomil 9p24-P22 ühe uue olulise RLS-iga aheldunud lookuse, LOD-skooriga 3,22. Mudelipõhine aheldusanalüüs, eeldades autosoom-dominantset pärandumisviisi, kinnitas 9p24-22 seost veel kahes RLS-ga perekonnas (LOD-skoor 3,77) ja hilisemal täpsemal kaardistamisel määratleti selle uue RLS lookuse kriitiline intervall. Autorid uurisid täpsemalt selles RLS lookuses kolm võimalikku kandidaatgeeni, kuid patogeenseid mutatsioone ei tuvastatud (Chen et al., 2004).

Lohmann-Hedrich jt teostasid aheldusanalüüsi saksa RLS-perekonnas, mille 37 pereliikmest läbi nelja põlvkonna, oli 15 haigestunud, kusjuures haigus oli ilmnunud peamiselt lapsepõlves või noorukieas (pärilikkusmuster autosoom-domineeriv). Nad määratlesid kromosoomil 9p tõenäolise uue RLS geenilookuse (autorid nimetasid selle RLS3), mille maksimaalne LOD-skoor on 3,60. Kõigil 12 uuritud patsiendil leiti ühine haplotüüp D9S974 ja D9S1118 vahel, mis hõlmas 9,9 Mb piirkonnas, mis oli RLS3 suhtes tsentromeerne. Lisaks oli neist 11-l ühine kuni D9S2189-ni väljavenitatud telomeerne haplotüüp, mis asub RLS3-s (Lohmann-Hedrich et al., 2008).

1.6.2.3.4.4 RLS4 (kromosoom 2q33) Pichler jt avastasid Lõuna-Tirooli isolaadis (n=530) RLS-patsientide (n=37) ülegenoomsel aheldusuuringul kromosoom 2q uue lookuse ja nominaalseid tõendeid seoste kohta kromosoomidega 5p ja 17p, kasutades oma uuringus nii mitteparameetrilist kui ka parameetrilist analüüsi. Järgnev genotüpiseerimine kinnitas tõendeid ahelduse kohta (mitteparameetrilise analüüsi LOD-skoor 5,5) markerite D2S311 ja D2S317 (11,7 cM) vahel. Nad leidsid, et ühine seitsme markeriga haplotüüp kromosoomi 2q33 piirkonnas esines identselt kõigil kolme perekonna alanevas liinis haigestunud 15 pereliikmel (need pered põlvnesid ühisest esivanemate paarist 10 põlvkonda tagasi).

Maksimaalne LOD-skoor 4,1 saadi markeril D2S2242 (Pichler et al., 2006). Kasutades 2 põlvkonna sekveneerimist piiritlet sama uurimisrühm kolme sugulussidemetes oleva RLS-haige RLS4 lookuses kandidaatpiirkonna suurusega 46,9 Kb, mis sisaldab geeni *KCTD18* ja eksoneid 10-13 geenist *SPATS2L* (Pilcher jt., 2013).

1.6.2.3.4.5 RLS5 (kromosoom 20p13, OMIM 611242) Levchenko jt määratlesid ülegenoomilises aheldusanalüüsis Prantsuse-Kanada sugupuus, milles eristusid RLS juhtumid (17 haigestunud üksikisikut, autosoom-domineeriv pärilikkusmuster) 5,2 Mb kandidaatpiirkonna, mis tähistati on RLS5-na ja mis asub kromosoomil 20p13 (maksimaalne LOD-skoor on 3,86, markeril D20S849) (Levchenko et al., 2006). Sas jt kinnitasid seda lookust suure, mitme põlvkonna esindajatest koosneva hollandi perekonna uuringul, kus esines varase algusega RLS haigestumist (keskmiselt 18 aasta vanuses), ning vähendas kriitilist piirkonda 5,2-lt Mb kuni 4,5 Mb-ni, ahelduse maksimaalne LOD-skoor 3.02 (Sas et al., 2010).

1.6.2.3.4.6 RLS6 (16p12.4) ja RLS 7 (19p13.3) Nagu RLS5, nii ka RLS-6 16p12.4 kromosoomis (Levchenko et al., 2009) – tuvastati suurtes prantsuse-kanada perekondades, kasutades seejuures vähendatud penetrantsusega autosoom-dominantset mudelit. Hiljuti identifitseeriti RLS-7 19p13.3 kromosoomis Iiri sugupuus. Piirkond katab 2,5 Mb ja sisaldab üle 100 geeni (Skehan et al., 2012). See asub 39 cM ülesvoolu teisest lookusest 19p13-es, näidates veenvaid tõendeid seose kohta suures itaalia RLS perekonnas (maksimaalne LOD = 2,61) (Kemlink et al., 2008).

1.6.2.3.5) Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS, *Genome-wide association-study*) ja uuringud mudelorganismidega (Kogu selle peatüki kohta on lisades kokkuvõtlik tabel)

Põhja-Euroopas läbi viidud GWAS-id on teinud kindlaks, et RLS-iga on seotud kuus erinevat geeni, mis ekspresseeruvad kesknärvisüsteemis ja teistes organites (Freeman ja Rye, 2013). Nendeks on *BTBD9* kromosoomis 6p21.2 (Stefansson et al., 2007), *MEIS1* kromosoomis 2p14 (Winkelmann et al., 2007), *PTPRD* kromosoomis 9p24.3-p23 (Schormair et al., 2008) *MAP2K5* kromosoomis 15q23, (Winkelmann et al., 2007)

SKOR1 kromosoomis 15q23 (Mignot, 2007) ja *TOX3* kromosoomis 16q12.1 (Winkelmann et al., 2011). Selles peatükis räägin ma tehtud GWAS-dest ja mudelorganismidega tehtud katsetest iga ülaltoodud geeni kohta eraldi.

1.6.2.3.5.1) *BTBD9* (*BTB (POZ) domain containing 9*) (URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114781>)

Asukoht: 6p21 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114781>)

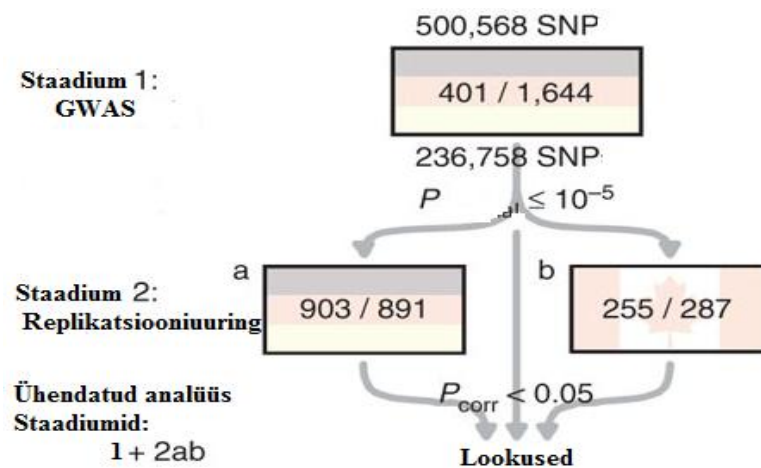
Funktsioon: On vajalik embrüogeneesis, näiteks jäsemete arenemises. *BTBD9* ekspresseerub perifeerses ja kesknärvisüsteemis. Seega võib *BTBD9* geeni funktsiooni häirumine mitmete mehhanismidega olla kaasatud RLS-i patofüsioloogiasse. RLS-i puhul seostatakse PLM-iga (Mignot, 2007).

Uuringud: Islandil viisid Stefansson, Rye jt läbi GWAS-i, (306 RLS haiget/15633 kontrollisikut) tüpiseerides haigestunud patsientide ja kontrollrühma proovid Illumina kiipidel, kasutades Human Hap300 & Hap300-duo+BeadNad leidsid, et *BTBD9* geeni introni SNP rs3923809 riskialleel A on statistiliselt oluliselt seotud RLS-iga ($p=2 \times 10^{-9}$, OR=1.8). See leid replitseerus teises islandlaste valimis (123/1233) ja tulemuseks saadi, et rs3923809 on seotud RLS-iga ($p = 4 \times 10^{-4}$, OR=1.8). Sama uuring USA valimis (188/662) andis tõenäosuseks $p=4 \times 10^{-3}$, OR=1,5. Samas näidati, et leitud riskialleel ei oma olulist tähendust neil patsientidel, kellel puudub PLM, mistõttu uurijate arvates on leitud SNP eelkõige markeriks PLM tunnusele. PLM sagedus unes oli tõesti korrelatsioonis rs3923809 A alleeliga ja homosügootidel AA oli 2x enam PLM unes kui seda alleeli mitteomavatel isikutel. Arvestades rs3923809 A alleeli suurt sagedust (ca 0,7) uuritud populatsioonides, saadi selle alleeli poolt populatsioonile omistatavaks riskiks 50% (fraktsioon RLS koos PLM-ga patsientidest, keda populatsioonis ei oleks, kui riskialleeli omavate isikute risk väheneks samale tasemele seda alleeli mitteomavate isikute riskiga) (Stefansson et al., 2007).

USA populatsioonis viisid Yang, Li, Chen jt valge rassi hulgas läbi perekonnapõhised assotsiatsiooniuuringud 38-s RLS perekonnas, 150 RLS patsiendil ja 84 kontrollisikul. Viidi läbi ka populatsioonipõhised assotsiatsiooniuuringud valimiga 189/560. Sellega sooviti saada teada, kas SNP rs2300478 *MEIS1*-s, rs9357271 *BTBD9*-s ja rs1026732 *MAP2K5/SKOR1*-s on seotud RLS-iga. Perekonnapõhise assotsiatsiooni uuringu (150/84) tulemused ei leidnud SNP rs9357271 *BTBD9* ja RLS-i vahel seost (Yang, Li, Chen, et al., 2011). Populatsioonipõhisel assotsiatsiooniuuringul (valim 189/560) leiti, et SNP rs9357271 riskialleeliga T, omab tugevat alleelset assotsiatsiooni RLS-iga ($p=0.0021$, OR=1.59) Võib öelda, et SNP rs9357271 *BTBD9* geenis on eelsoodumuseks sporaadilisele RLS-ile aga ei ole seotud perekondliku

RLS-iga (Yang, Li, Chen, et al., 2011). SNP rs9357271 olulist seost RLS-iga kinnitab ka Winkelmann kolleegidega. Nemad said GWAS-il P väärtuseks $6.74 \cdot 10^{-7}$, replikatsiooniuringute tulemusena $p=2.01 \cdot 10^{-16}$ ja $P_{\text{meta}}=7.75 \cdot 10^{-22}$ (OR=1.47) (Winkelmann et al., 2011).

Saksamaal läbi viidud GWAS-is kasutati 500,568 SNP-i. Esimeses etapis viisid Winkelmann jt läbi GWAS-i, tüpiseerides haigestunud patsientide ja kontrollrühma proovid kasutades *Affymetrix 500K kiipi* Riskialleelide rikastamiseks ja fenotüübilise heterogeensuse minimeerimiseks valisid nad katseisikuteks omavahel sugulussidemetes olevad RLS patsiendid ($n = 401$). Kontrollisikud valiti elanikkonna kohordist juhuslikult ($n=1644$). Statistilise analüüsi aluseks valiti vaid kvaliteetsete genotüüpide SNP-d, et vähendada valepositiivseid signaalide arvu. Kõik kvaliteedikontrolli filtrid läbis kokku 236 758 SNP-i (joonis 9). Tulemuseks saadi RLS-i ja SNP rs9296249 riskialleeli T assotsiatsioon statistiliselt olulise väärtusega ($p=2,19 \cdot 10^{-6}$, OR=1,67). Samuti leiti GWAS-iga, et SNP-i rs9357271 riskialleel T on seotud RLS-iga olulisel määral ($P=5,48 \cdot 10^{-6}$, OR=1,66). Sama uuringutegrupi replikatsiooniuringud (viidi läbi 28 SNP-ga, mille p väärtus oli väiksem või võrdne 10^{-5} GWAS-is), kus katsealused olid sakslased (grupp a, 903 RLS-i haiget / 891 kontrollpatsienti) ja kanadalased (grupp b, 255 RLS-haiget / 287 kontrollpatsienti) (joonis 9.), leiti, et sakslate grupis SNP rs9296249 on seotud RLS-iga olulisel määral ($p=1.61 \cdot 10^{-6}$, OR=1,67) ja samuti kanadalaste grupp, kus $p=4.14 \cdot 10^{-3}$. Sama edukad olid replikatsiooniuringud SNP rs9357271-ga, kus samade valimite alusel saadi p väärtus sakslaste grupis $1.85 \cdot 10^{-6}$ ja kanadalaste grupis $p=2.48 \cdot 10^{-3}$. Kui võeti kokku staadiumite 1, 2a ja 2b statistiline olulisus ja leiti sealt kokkuvõtlik p väärtus, siis SNP-is rs9296249 saadi selleks $3.99 \cdot 10^{-18}$. Kui kasutati Bonferroni korrektsiooni testi, siis saadi p_{meta} väärtuseks $9,44 \cdot 10^{-13}$ (Winkelmann et al., 2007).



Joonis 9. Illustreeriv pilt Saksamaal läbi viidud GWAS-st (Winkelmann et al., 2007, muudatustega).

Uuringud mudelorganismidega: Loomkatsed on andnud häid tulemusi *BTBD9* funktsiooni uurimises ja RLS-i seoseliste molekulaarsete mehhanismide selgitamisel (Freeman et al., 2012; DeAndrade et al., 2012). *BTBD9* bioloogilise toime uurimiseks kasutati esialgu traditsioonilist funktsioonikao meetodikat. Uuriti *BTBD9* (CG1826) *Drosophila* genoomi ortoloogi mutatsioone kas kogu organismis või dopamiini sisaldavates neuronites (Freeman et al., 2012), samuti uuriti hiirte *BTBD9* geeni puudulikkuse (DeAndrade et al., 2012) seoseid RLS-le iseloomulike tunnustega. Need hõlmavad mootorset rahutust ja unehäireid (Freeman et al., 2012; DeAndrade et al., 2012), mis kaovad dopamiini retseptori agonisti manustamisel (Freeman et al., 2012).

BTBD9 geenipuudulikkuse korral suurenes hiirtel raua kontsentratsioon vereseerumis (DeAndrade et al., 2012). Aju dopamiini vähenemine *Drosophila* mutantidel ei paista hiirmudeli puhul olevat iseloomulik ning türosiini-hüdroksülaasi taseme vähenemine ei põhjusta aju dopamiini vähenemist. Emma-kumma mudeli puhul oleks huvitav uurida dopaminergilist neurotransmissiooni sünaptilisel tasemel, arvestades, et *in vitro* uuringud, milles kasutati roti feokromotsütoomi (PC12) rakke, näitavad, et *BTBD9* võib olla sünaptiliste vesiikulite transportijaks (Hashimoto et al., 2012). Üks oletatav RLS-i patofüsioloogiline toimemehhanism võib seisneda sünaptilise dopamiinergilise signaali võimendumine aju rauasisalduse esmase vähenemise korral, mistõttu pärssivate autoreceptorite kaudu aktiveeruvad dopamiini agonistid, ning tulemuseks on kliinilised haigustunnused (Rye ja Trotti, 2012). *BTBD9* üleekspressioon inimese embrüonaalsetes neerurakkudes vähendab raua ainevahetust reguleeriva valgu-2 (IRP2) taset, mis on tõenäoliselt ferritiinitaseme kui säilitatava mobiliseeritava raua samaaegse taseme tõusu põhjuseks (Freeman et al., 2012).

1.6.2.3.5.1) *MEIS1* (*Meis homeobox 1*) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4211>)

Asukoht: 2p14 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4211>)

Funktsioon: *MEIS1* kodeerib homeobox proteiini, mis kuulub TALE perekonna homeodomeeni sisaldavate valkude hulka ja osaleb heterodimeerilise kompleksi moodustamises PBX ja HOX valkudega, et tõsta afiinsust ja spetsiifilisust DNA sidumisel HOX valkudega (Moens ja Selleri, 2006). See on ka osa HOX transkriptsiooni reguleerivast võrgustikust, mis määrab seljaaju motoneuronite identiteedi ja ühenduvuse (Dasen et al., 2005). *MEIS1*, nagu paljud teisedki homeobox geenid, sisaldab pikki kõrgelt konserveerunud segmente oma mittekodeerivates 5' ja 3' intergeenses ning intrageenses regioonis (Mercader et al., 1999), millest üks (intergeenne) funktsioneerib võimendajana, ning teised kontrollivad embrüogeneesis ajalist ja ruumilist geeniekspressiooni läbi keeruka kuid hästi juhitud vastastikmõju teiste *cis*-ja/või *trans*-faktoritega (Xiong et al., 2009). Osaleb proksimaal-distaalse jäsometelje arengul ja neuronaalsel diferentseerumisel. *MEIS1* ekspressioon on eriti tugev dopamiinergilistes neuronites, mis asuvad aju mustaines. RLS-i puhul seostatakse PLM-iga (Mignot, 2007). Kuna aju mustaines on RLS-i puhul leitud mitmes uuringus madal raua tase (Godau et al., 2007), siis võib siinkohal raua ja dopamiini koostöö olla tähtsal kohal RLS-i patofüsioloogias. On ka leitud, et *MEIS1* ekspressioon on tugev ka lähedal asuvates aju punatumades. See on regioon, mis reguleerib jäseme liikumist ja koordinatsiooni (Lavoie ja Drew, 2002) ja samuti raua tasemega tehtud katsed näitavad, et see aju piirkond on seotud RLS-iga (Bucher et al., 1997).

Uuringud: Winkelmann jt leidsid oma uuringutes *MEIS1* (seotud RLS7-ga) seose RLS-iga. Selle leiu tulemust kinnitasid kaks sõltumatut genoomi replikatsiooniuuringut ja samuti GWAS (vt pt BTBD9). Eelnimetatud autor kolleegidega avastasid olulise seose RLS riski ja rs2300478 G alleeli leidumise vahel *MEIS1* geenis, OR väärtusel 1,74. GWAS andis rs2300478 ja RLS-i vahelise seose p väärtuseks $4,89 \cdot 10^{-10}$. Sakslaste replikatsiooniuuring andis tulemuseks $p=5,93 \cdot 10^{-12}$ ja kanadalaste oma vastavalt $p=2,19 \cdot 10^{-3}$. Metaanalüüside tulemusel ja Bonferroni korrektsiooni kasutades saadi p väärtuseks $8,08 \cdot 10^{-3}$ (Winkelmann et al., 2007).

Xiong jt sekveneerisid kõik *MEIS1* 13 eksonit ja nendega külgnevad splaissimise regioonid 285-l kinnitatud kliinilise diagnoosiga RLS patsientidel kuid tuvastanud ühtki haigust tekitavat mutatsiooni. Samas leiti RLS-ga oluliselt assotsieerunud riskihaplotüübi GT / GG esinemine, mille moodustasid introonsed SNP-d rs12469063, riskialleeliga G ja rs2300478,

riskialleeliga G ($p = 0,0095$) 28 RLS patsiendi ajuproovis. Samuti avastati introonse RLS riski haplotüübi suhtes homosügootsetel RLS-patsientidel *MEIS1*-s mRNA ekspressiooni märkimisväärne vähenemine reaajaja kvantitatiivsel PCR-il (*Real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) lümfoblastoidsetes rakuliinides ja ajukoes võrreldes riskita haplotüübi homosügootsete patsientidega; samuti *MEIS1* valgutaseme vähenemine samades lümfoblastoidsetes rakuliinides -ja ajukoes riski haplotüübiga homosügootsete indiviidide proovides võrreldes nende isikute proovidega, kellel riskihaplotüüpi ei esinenud. Autorite arvates on nende andmete alusel võimalik eeldada, et *MEIS1* geeni ekspressiooni vähenemine, ilmselt introonse cis-regulatsiooni elemendi (elementide) toimel, loob eelsoodumuse RLS-i tekkeks (Xiong et al., 2009). USA-s Yang, Li ja teiste kolleegide läbi viidud populatsioonipõhised assotsiatsiooniuuringud (vt. pt. BTBD9) kinnitasid, et SNP rs2300478 alleel G omab tugevat alleelset assotsiatsiooni RLS-iga ($p=0.0001$, $OR=1,65$). Samas perekonnapõhise assotsiatsiooni uuringu tulemused ei leidnud seost SNP rs2300478 riskialleeli G ja RLS-i vahel. Seega võib öelda, et SNP rs2300478 *MEIS1* geenis põhjustab sporaadilist RLS-i aga ei ole seotud perekondliku RLS-iga (Yang, Li, Chen, et al., 2011).

Uuringud mudelorganismidega: Mudelorganismide uuringud näitavad, et *MEIS1-l* on oluline roll jäsemete arengus (Azpiazu ja Morata, 2002), seljaaju motoneuroni identiteedi kujunemises ja ühenduvuses (Mercader et al., 1999), ning sensoorsete organite embrüonaalarengu etapis perifeerse närvisüsteemi arengus (Kurant et al., 1998). Postembrüonaalses etapis ei ole *MEIS1* närvikudedes piisavalt põhjalikult uuritud. Teada on vaid, et see avaldub täiskasvanud hiirte väikeajus, eesajus ning märkimisväärselt ka domamiinergiliste neuronite mustaines (Lein et al., 2007). *MEIS1* mängib rolli leukeemia (Moskow et al., 1995) ja neuroblastoomi arengus (Spieker et al., 2001). Hilisemad *Caenorhabditis elegans* uuringud on näidanud, et *unc-62*, *MEIS1* ortoloog, oli üks 64-st geenist, mille arengujärgne väljalülitamine RNAi meetodit kasutades pikendas selle organismi eluiga. Sarnast efekti on täheldatud ka inimaju rakukultuurides, eriti RLS patsientidel, viidates selle võimalikule mõjule vananemisele (Curran ja Ruvkun, 2007). Koos viitavad need andmed võimalikule funktsionaalsele seosele *MEIS1* ja RLS patogeensete radade vahel (Xiong et al., 2009).

1.6.2.3.5.3 *PTPRD* (protein tyrosine phosphatase, receptor type, D) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5789>)

Asukoht: 9p23-p24.3 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5789>)

Funktsioon: Geeni funktsiooniks on imetajate motoneuronite aksonite kasvu reguleerimine (Uetani et al., 2006). *PTPRD* ekspressiooni reguleerib östradiool (Naciff et al., 2003). Samas on teada, et östradiool indutseerib TH tõusu seerumis, mis omakorda tekitab RLS sümptomeid (Pereira et al., 2010).

Uuringud: Aastal 2008 avaldasid Schormair jt artikli, kus nad kirjutasid GWAS-ist, mis hõlmas Saksamaalt, Austriast, Tšehhi Vabariigist ja Kanadast pärit 2458 haigestunud üksikisikut ja 4749 kontrollisikut. Leiti seosed RLS-i ja SNP rs4626664 A riskialleeliga ($p=5,91 \cdot 10^{-10}$, OR=1,44) ja rs1975197 T riskialleeliga ($p=5,81 \cdot 10^{-9}$, OR=1,31) *PTPRD* geenis (Schormair et al., 2008). Seda seisukohta kinnitas ka perepõhine replikatsiooniuuring, mis hõlmas 144 pereliiget 15 perekonnast, ning haigestunud isikute/kontrollisikute seoseuuring, mis hõlmas 189 RLS- patsienti ja 560 kontrollisikut (Walters et al., 1996).

Yang, Li, Yang jt USA-s viisid valge rassi indiviididega läbi nii perekonnapõhiseid kui populatsioonipõhiseid assotsiatsiooniuuringuid, et replitseerida seoseid *PTPRD* ja RLS sündroomi vahel. Genotüpiseeriti 2 intronis asuvat SNP-i rs1975197 ja rs4626664. Valimis oli 144 perekonnaliiget 15-st perekonnast ja samuti 560 kontrollisikut. Tulemuseks saadi, et SNP rs1975197 alleel T oli statistiliselt oluliselt seotud RLS sündroomiga ($p=0.015$). Saksa populatsioonis saadud oluline seos SNP rs4626664 alleeliga A ei replitseerunud ($p=0.622$). Populatsioonipõhine kontrolluuring viidi läbi 189 RLS patsiendiga. Kontrollgrupis oli 560 indiviidi. Uuriti SNP rs1975197 ja SNP rs4626664 geenis *PTPRD*. Tulemuseks saadi statistiliselt oluline alleelne korrelatsioon SNP rs1975197 ja RLS vahel ($p=0.0004$), kuid seos SNP rs4626664 alleeliga A ei replitseerunud jällegi. Seega, USA populatsioonis omab *PTPRD* geenis selget riski RLS-ile vaid SNP rs1975197 alleel T (Yang, Li, Yang, et al., 2011).

1.6.2.3.5.4 *MAP2K5* (*Mitogen-activated protein kinase 5* (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5607>))/ *SKOR1* (*SKI family transcriptional corepressor 1*) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/390598>)

Asukoht: *MAP2K5*: 15q 23 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5607>)

Funktsioon: Geen reguleerib lihaste diferentseerumist (Dinev et al., 2001) ja toetab dopamiinergiliste neuronite eluvõimet (Cavanaugh et al., 2006).

Asukoht: SKOR: 15q 23 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/390598>)

Funktsioon: Geeni ekspresseeritakse arengu käigus seljaaju dorsaalse sarve interneuronites (Mizuhara et al., 2005) ja väikeaju Purkinje rakkudes (Arndt et al., 2007). Geen surub maha BMP signaalülekande kui seostub Smad1-ga (Arndt et al., 2007). Kuna dopamiinergilised retseptorid asuvad üle kogu seljaaju, nii ventraalses kui ka dorsaalses sarves ja on teada, et dorsaalne sarv võib põhjustada paresteesiaid ja valuaistinguid (Facheris et al., 2010), siis arvatakse, et *SKOR1* roll RLS patofüsioloogias on seljaaju sensoorsete ja väikeaju motoorsete ülekannete mõjutamine ning RLS-i puhul valu ja ebamugavustunde tekitamine aga mitte PLM-i indutseerimine (Freeman ja Rye, 2013).

Uuringud: USA-s Yangi ja teiste poolt läbi viidud perekonnapõhised assotsiatsiooniuringud (vt. pt. BTBD9) kinnitasid, et SNP-i rs1026732 alleel G regioonis, mis hõlmab nii geeni *MAP2K5* kui ka geeni *SKOR1* omab tugevat assotsiatsiooni RLS-iga ($p=0.01$). Seega SNP rs1026732 *MAP2K5/SKOR1*-s on tähtis riskifaktor perekondliku RLS-i puhul. Sama uurimisrühm leidis populatsioonipõhisel assotsiatsiooniuringul (vt. pt. BTBD9), et SNP-i rs1026732 riskialleel G omab tugevat alleelset assotsiatsiooni RLS-iga ($p=0.0011$, $OR=1.55$). Seega omab *MAP2K5/SKOR1* SNP rs1026732 tugevat assotsiatsiooni ka sporaadilise RLS-iga. Kuna SNP rs1026732 asub *MAP2K5* geeni ja *SKOR1* geeni vahel, siis ei ole teada, kumb geenidest põhjustab RLS-i (Yang, Li, Chen, et al., 2011).

Saksamaal läbi viidud GWAS (922 RLS haiget ja 1526 kontrollisikut) ja replikatsiooniuringute käigus leiti *MAP2K5/SKOR1* geeni SNP rs12593813 alleelil G statistiliselt oluline seos RLS-iga ($p_{meta}=1.37*10^{-22}$) (Winkelmann et al., 2011).

Saksamaal läbi viidud GWAS uuringus (vt. pt. BTBD9) leiti, et *MAP2K5* geeni järgnevate SNP-idel olulised seosed RLS-ga: rs12593813 riskialleelis G ($p=1.85*10^{-6}$), rs11635424 riskialleelis G ($p=1.77*10^{-6}$), rs4489954 riskialleelis G ($p=2.44*10^{-6}$), rs3784709 riskialleelis C ($p=3.56*10^{-6}$) ja rs1026732 riskialleelis G ($p=4.67*10^{-7}$). Leiti ka SNP rs6494696 geenis *MAP2K5/SKOR1(LBXCOR1)*, mille riskialleeliks on G ja p väärtus $1.79*10^{-6}$. Samade SNP-de statistiline olulisus pärast kõiki vaheetappe (vt pt. 1.6.4.4.1) ja pärast Bonferroni korrigeerimist oli vastavalt: rs12593813 $p=2.51*10^{-10}$, rs11635424 $p=8.64*10^{-11}$, rs4489954 $p_{meta}=6.35*10^{-11}$, rs3784709 $p_{meta}=9.61*10^{-11}$ ja rs1026732 $p_{meta}=1.44*10^{-11}$, rs6494696 $p_{meta}=4.7*10^{-11}$ (Winkelmann et al., 2007).

1.6.2.3.5.5) *TOX3* (TOX high mobility group box family member 3) (URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27324>).

Asukoht: 16q12,1 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27324>).

Funktsioon: Reguleerib kaltsiumist sõltuvat transkriptsiooni neuronites ja on väga oluline neuraalsele plastilisusele (Yuan et al., 2009) ja neuronite ellujäämisele (Dittmer et al., 2011). *TOX3* roll rinnavähis on teada, nimelt reguleerib *TOX3* rakkude proliferatsiooni (Cowper-Sal·lari et al., 2012) aga roll RLS tekkeks on uurimisel (Freeman ja Rye, 2013).

Uuringud: GWAS (922 RLS haiget ja 1526 kontrollisikut, 301 406 SNP-d) ja replikatsiooniuuringute käigus (3935/5754 valimiga ja 76 SNP-ga), mis viidi läbi valge rassi hulgas Saksamaal, leiti kaks uut RLS-iga seotud lookust: intergeenne regioon kromosoomis 2p14 (rs6747972 riskialleeliga A, $p_{\text{meta}}=9.03 \times 10^{-11}$, OR=1,23) ja lookus asukohaga 16q12.1 (rs3104767 riskialleeliga G, $p_{\text{meta}}=9.4 \times 10^{-19}$, OR=1,35). Viimane sisaldab *TOX3* 5' lõppu ja mittekodeerivat RNA-d BC034767 (Winkelmann et al., 2011).

1.6.2.3.6 Eksoomi sekveneermise uuring

Terve eksoomi sekveneermine on genoomi kodeerimispiirkondade selektiivseks sekveneermiseks tõhus strateegia. Esimene RLS-pere kogu eksoomi sekveneermine, mille tulemused avaldati, viidi läbi Saksamaal autosoom-dominantse päriliku RLS-pere seitsme haigestunud ja kahe haiguskahtlusega liikmega; uuringul määratleti kolm uut missenssi mutatsiooni (punktmutatsioon, kus üks aminohape asendatakse teisega) ja üks mutatsioon splaiss saidis. Mutatsioonid leiti geenides: *PCDHA3* (5q31)- (kõige tõenäolisemalt seotud RLS-iga)-ekspresseeritakse neuronites ja raku sünapside, kus ta reguleerib rakkudevahelisi interaktsioone. *WWC2* (4q35.1)- funktsioon teadmata. *ATRN* (20p13)- ekspresseerub aktiveeritud T-rakkudel. *FAT* (5q33.1)- funktsioneerib retseptorina juhteteedes, mis reguleerivad kasvamist ja geeniekspressiooni. Kõik neli *PCDHA3* geeni eksonit, mis olid kõige tõenäolisemad põhjuslikud kandidaadid (seotud RLS8 lookusega, OMIM 615.197), sekveneeriti täiendavalt 64-l sõltumatul RLS haigestunud ja 250-l kontrollisikul ning kahel haigestunud isikul ja ühel kontrollisikul avastati kolm täiendavat haruldast missenssi varianti (sagedus < 1%), mille patogeensus ei ole teada (Weissbach et al., 2012). Kõigi leitud mutatsioonide potentsiaalse patogeensuse selgitamiseks RLS kontekstis on vaja täiendavaid uuringuid ja võimalikke funktsionaalseid katseid.

1.7 Tuleviku uurimissuunad

Mõlemad, nii perekonna- kui ka assotsiatsiooniuuringud on osutanud RLS-i puhul nii suurematele kandidaat genoomiregioonidele kui ka otseselt kandidaatgeenidele. Siiski, tänaseni ei ole leitud ühtegi sellist geneetilist varianti, mille omamine oleks piisav, et indutseerida RLS-fenotüübi arengut (Schulte ja Winkelmann, 2014). Me ei tea, kas geenides leitud SNP-d mõjutavad RLS-i alguse vanust patsiendil või miks RLS ja PLM sümptomid tekivad peamiselt öhtuti ja öösel. Kuna leitud lookused ei seleta, miks on naistel RLS prevalents peaaegu 2 korda suurem kui meestel või perekonna klastreid, siis oletatakse, et praeguseks on avastamata geene või keskkonnafaktoreid, mis RLS-i väljakujunemist oluliselt mõjutavad (Mignot, 2007).

Tõeliselt põhjusliku variandi identifitseerimine oleks väga kasulik, kuna see hõlbustaks suuresti patofüsioloogilisi uuringuid ja annaks lähtepunkti spetsiifiliste RLS-i loomudelite loomisele. Kuid üks kõige üldisemaid leide enamikus uuringutes viimase kahe aastakümne jooksul on olnud geneetiline heterogeensus. Äärmuslikul juhul võib see tähendada, et ei ole "põhjuslikke" allele RLS-le ning et RLS fenotüüp on alati mitmete geneetiliste tegurite tagajärg, mis toimivad üheskoos, kuigi suurte sugupuude põhjal võiks esmapilgul arvata teisiti. Seoste analüüsi kontekstis kajastub geneetiline heterogeensus asjaolus, et kõigist uuritud RLS-i perekondadest ainult vähene hulk perekondi tegelikult seostub kirjeldatud lookustega ning on olemas arvukalt perekondi, kelle puhul ei ole mingit olulist seose signaali võimalik identifitseerida, kuigi perekonna struktuur oleks sobinud selle tegemiseks või kelle puhul oli olemas rohkem kui üks seose signaal (Winkelmann et al, avaldamata andmed). Ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute tulemused rõhutavad samuti geneetilist heterogeensust kuivõrd praeguseks identifitseeritud assotsiatsioonisignaalid seletavad ära ainult umbes 6,8% RLS päritavusest, kuigi nad omavad suhteliselt suurt riski (Winkelmann et al., 2011). Kasvavad GWAS valimite suurused paljastavad tõenäoliselt üha rohkem praegu puuduvast pärilikkusest. Samas on ebatõenäoline, et GWAS, nii nagu me mõistame neid täna, oleks võimeline identifitseerima ülejäänud geneetilisi tegureid, mis toetavad RLS fenotüüpi (Schulte ja Winkelmann, 2014).

RLS on geneetiliselt keeruline haigus ja selle keerukus on ilmselt tähistatud mitte ainult heterogeensuse asjaoluga, vaid ka väga erinevate variantidega, mis tõenäoliselt osalevad.

Need võivad hõlmata variante, mis esinevad elanikkonnal erineva sagedusega – tavalised, haruldased ja kõik, mis jääb sinna vahele. Need sisaldavad ka erinevaid variantide tüüpe, nagu kodeerivad ja mittekodeerivad variandid koos struktuursete variatsioonidega, millel on tugevam või nõrgem mõju fenotübile, kas koos tegutsedes, põhjustades fenotüüpi oligo- või polügeensel viisil või nagu geneetilised modifitseerijad. Siinkohal on huvitav märkida, et RLS-i geneetilises uurimises on juba näha esimest edukat järgmise põlvkonna sekveneerimise tehnoloogiate rakendamist, et näiteks paremini uurida haruldaste või mittekodeerivate geneetiliste variantide rolli või leida lõpuks põhjulikud variandid perekonna aheldusuuringutes esilekerkinud lookustest (Schulte ja Winkelmann, 2014).

Edaspidi on ilmselt vaja rakendada süsteemseid uurinuid, mis hõlmaksid enam ka transkriptsiooni, metülatsiooni, proteoomika ja metabooloomika alaseid uuringuid, et jõuda RLS-i tõeliste põhjusteni (Schulte et al., 2014).

KOKKUVÕTE

Käesolev bakalaureusetöö on kirjanduse põhjal koostatud uurimistöö. Minu bakalaureusetöö eesmärgiks oli anda kirjanduses avaldatud materjalide abil ülevaade RLS-i kliinilisest olemusest ja patofüsioloogiast ning põhjalikumalt käsitleda viimaste aastate geneetilistes uuringutes avastatud kandidaatgeene ja arvatavalt põhjuslikult seotud riskialleele erinevates genoomipiirkondades.

Aheldusuuringutega on leitud praeguseks seitse kromosoomipiirkonda, mis on seotud RLS-iga. Samas ei teata päris kindlalt milles see seos seisneb. Siiski saab RLS3 kromosoomi regiooni 9p24-p22 seostada *PTPRD* funktsiooniga RLS puhul, kuna *PTPRD* geen asub samuti 9p23-p24.3 kromosoomi regioonis. RLS1 puhul on Winkelmann koos kolleegidega aastal 2008. leidnud seose SNP rs7977109 ja RLS1 vahel. See SNP paikneb *NOS1* geenis. Siit saab geenifunktsiooni põhjal edasi uurida kuidas see geen võib olla seotud RLS-iga. RLS4 regioon kromosoomis 2q33 sisaldab geeni *KCTD18* ja geeni *SPATS2L* eksoneid 10-13. Siinkohal saab jälle eeldada, et RLS4 funktsioon on seotud nende geenidega ja uurides põhjalikumalt nende geenide funktsioone või tehes GWAS-e ja leides statistiliselt olulisi SNP-e jõutakse märksa lähemale RLS4 regiooni funktsiooni suhtes seoses RLS-iga.

Ülegenoomsete assotsiatsiooniuringutega on leitud kuus geeni, milles asuvad ühenukleotiidsed polümorfismid on samuti statistiliselt suurel määral seotud RLS-iga. Kuuest leitud geenist viis on kõik seotud kas dopamiinergilise neurotransmissiooniga, jäsemetelje arenguga või reguleerivad hormoonide taset, mis RLS-i indutseerivad. Seega saab seostada neid geene RLS-iga mitte ainult GWAS-i poolt leitud SNP-ide tõttu, vaid ka patofüsioloogiliselt. Ainult *TOX3* geeni ei saa funktsiooni järgi seostada, kuigi on leitud RLS-iga seotud SNP rs6747972 *TOX3*-s. Siiski saab ka SNP-ide asukoha järgi teha mingeid järeldusi. Näiteks, kuna kõik GWAS-iga leitud SNP-id on introonsed, siis peab neil olema regulatoorne funktsioon. Lootustandvad uurimismeetodid on teise põlvkonna sekveneerimistehnikad, millega saaks detekteerida kõik genoomi variandid, mis fenotüüpi mõjutavad. Oma töös kajastasin ka praeguseks ainukest teise põlvkonna sekveneerimistehnika meetodil tehtud uuringut- eksiooni sekveneerimist, mille tulemusena leiti täiesti uued geenid, mida RLS-iga seoses varem ei ole leitud.

Kuna leitud geenid asuvad eksonites, siis võivad nad mõjutada RLS-i näiteks valkude kaudu. Siinkohal on edasised uuringud vajalikud.

Patofüsioloogia kohapealt võiks öelda, et kesksel kohal on ikkagi dopamiin ja raud. Glutamaadiga ei ole veel piisavalt katseid tehtud aga on leitud, et glutamaat põhjustab õist ärkvelolekut aga mitte PLMS-i. Türeoidhormoonide kõrge kontsentratsioon seerumis põhjustab samuti RLS-i ja seda omakorda võivad põhjustada dopamiini, raua ja östradioli madal kontsentratsioon seerumis. Patofüsioloogia ja geneetika on omavahel seotud. Dopamiini taset mõjutab näiteks *MAP2K-d*, sest tema funktsiooniks on toetada dopamiinergiliste neuronite eluvõimet. Kui *MAP2K* funktsioon on pärsitud, siis on dopamiini transport häiritud ja see võib põhjustada RLS-i. Samuti geen *PTPRD* reguleerib östradioli taset organismis. Kui *PTPRD* funktsioon on häiritud, siis tekib östradioli seerumisse liiga palju, mis omakorda indutseerib TH tõusu seerumis ja tekivad RLS sümptomid. Geen *MEIS1*-e ekspresseeritakse aju mustaines ja punastes tuumades. Mõlemad piirkonnad on seotud mootorika kontrolliga ja kui geeni töö on pärsitud, siis võib raud samuti nendes piirkondades madalale tasemele langeda. Siit edasi väheneb dopamiini tase ja kuna geen ekspresseerub jäsemete lihastes, siis tekivad seal RLS-i motoorsed sümptomid. Geen *BDBT9* ekspresseerub maksas ja mõjutab ferritiini taset ja rauavarusid organismis. Kui geeni töö on häiritud, siis rikub see raua homöostaasi ja seerumi raua tase langeb. Kuna raud on dopamiini sünteesil tähtis kofaktor türosiin hüdroksülaasile, siis langeb ka dopamiini tase ja tekib PLM. Nagu juba öeldud, siis *TOX3* roll RLS-is on uurimisel aga on leitud introonne SNP rs6747972. SNP-i asukoht intronis viitab sellele, et *TOX3* roll RLS-is peab olema regulatoorne.

Kuigi geneetilised uuringud ei ole praeguseks päris põhjuslikku geeni leidnud, siis kliiniliselt näib olevat rohkem selgust. Teada on medikamendid, mis RLS-i põhjustavad ja millistega on võimalik RLS-i ravida. Polüsomnograafilise ja aktigraafi uuringuga on võimalik diagnoosida RLS-i ja vajadusel määrata ravi. Siinkohal on aga kitsaskohaks meedikute vähene teavitatus RLS-ist.

Praeguseks hetkeks leitud riskialleelide efekt pole 100%-line aga edasiste uuringute tulemusena praeguseks leitud kandidaatgeenide ja SNP-ide riskialleelidega võidakse tulevikus leida konkreetne mutatsioon RLS põhjuslikus geenis. Selline avastus oleks kliiniliselt väga kasulik, sest patsiendi vereproovist DNA alusel saab teha kindlaks, kas RLS-i põhjustav mutatsioon on patsiendi DNA-s. Kui see nii on, siis saab patsiendil kahtlustada RLS-i.

Patsiendile oleks selline uuring ka kasulik, sest näiteks kui patsiendil ei leita RLS riski-SNP-e, aga ometi on tal tugevad RLS-sümtomid, siis võib olla tegu sekundaarse RLS-iga ja meedikud võivad patsiendil uurima hakata hoopis teisi haigusi, mille foonil RLS on välja kujunenud. Sellise süsteemi eelis polüsomnograafi ees on aja kokkuhoid, sest polüsomnograafia peab inimene magama terve öö ja mõnikord ka mitu ööd haiglas. Aga suurem eelis oleks see, kui tänu sellisele diagnostikale leitaks kiiremini patsientidel mõni tõsine haigus, mis on tekkinud RLS foonil. Arvatavasti muutub sekveneerimine tulevikus sedavõrd kättesaadavaks, et sellest saabki meetod põhjuslike haigusgeenide skanneerimisel.

Patophysiological and Genetic Aspects of Restless Legs Syndrome (RLS)

Marju Bani

SUMMARY

RLS is very complicated disease that we know very little about. It makes people move their limbs in order to get rid of pain or discomfort what they feel in their limbs. As the symptoms are expressed more in the evenings and at night, then this disease does not let people sleep good or fall asleep at all. In very many cases RLS is accompanied by periodic limb movement disorder (PLMD) which makes the patients limbs to move for the hole night although the patient himself/herself is not aware that he/she is moving limbs all the night. When RLS and PLMD are combined then there is a situation where patient cannot fall asleep because of RLS and cannot sleep at night because of RLS symptoms that cause sleep fragmentations and thirdly the patient is tired in the morning because he/she has been moving the legs all night because of PLMD.

Linkage analyses that have been done with families refer at least to seven different chromosome regions that could have causal association with the development of RLS pathology. Genome-wide association studies (GWAS) have been pretty successful in pointing out many single nucleotide polymorphism (SNP) risk allelees that could refer to RLS genetic inclination when having them in genome. In spite of these investigations in order to understand the causal association between RLS and genome regions that have been found it is necessary to carry out additional genetical and functional investigations.

My present bachelor thesis on the basis of literature:

- To give more thorough review about candidate genes and risk alleles in different regions of genome that has been discovered durning recent years in result of genetic investigations
- To give wider knowledge about RLS concerning patophysiology
- To give wider knowledge about RLS concerning medical side of the disease

For now the scientists have found seven chromosome regions with linkage analyses that are connected with RLS. At the same time noone knows exactly what this association is about.

In spite of this it is possible to associate RLS3 chromosome region 9p24-p22 with the function of *PTPRD* because *PTPRD* is also located in chromosome region 9p23-p24.3. What concerns RLS1 then Winkelmann and colleagues have found an association on the year 2008 between RLS1 and SNP rs7977109. This SNP is located in a gene called *NOS1*. From here further investigations concerning *NOS1*'s functions are needed to investigate in order to come to conclusion how this gene might be associated with RLS. RLS4 region (2q33) includes gene *KCTD18* and the exons 10-13 of gene *SPATS2L*. In this case we can also assume that the function of RLS4 is connected with these genes and when studying the functions of these genes or doing GWAS and founding statistically relevant SNPs we could reach much further in understanding the functional association between RLS4 region and RLS.

GWASs have found six genes where are located SNPs that are statistically associated with RLS. Out of these six genes five are all connected with dopaminergic transmission, limb development or regulate the level of hormones that induce RLS. Because of that it is possible to associate these genes with RLS not only because of SNPs that GWASs have found but also pathophysiologically. Only *TOX3* gene we cannot associate with RLS on the basis of function, although there has been found SNP rs6747972 in *TOX3*. But we can do some conclusions on the basis of SNPs locations. For example: All the SNPs that have been found with GWAS are intronic and because of that they must have regulatory function in RLS.

Hopeful investigation methods are next-generation sequencing technology with what it would be possible to detect all the variants in genome that affect phenotype. In my work I also talk about the only next-generation sequencing technology method that has been performed concerning RLS. It is exome sequencing technique and as a result of this investigation came out totally new genes that have never been found concerning RLS. As all these genes are located in exons then it is possible that they influence RLS through proteins. Here are further investigations necessary.

As for pathophysiology I would say that dopamine and iron play the most important roles. Glutamate causes wakefulness at night but not periodic limb movements in sleep (PLMS). When thyroid hormones (TH) are high in serum then this causes RLS symptoms but the decrease of TH in serum can be caused by low level of dopamine, iron and estradiol in serum. Pathophysiology and genetics are combined and influence each other. For example the level of dopamine is influenced by *MAP2K* because the function of this gene is to support the viability of dopaminergic neurons.

When the function of *MAP2K* is under-regulated then the transportation of dopamine is inhibited and this can cause RLS. Another example is gene *PTPRD* that regulates the level of estradiol in organism. When the function of this gene is inhibited then too much estradiol comes to serum and this induces the rise of TH level which results in RLS symptoms. *MEIS1* is expressed in substantia nigra and red nucleus. Both of these regions are connected with controlling motoric movements and when this gene does not function normally then the level of iron can go very low in these regions. As a result the level of dopamine decreases and as this gene is expressed in limb muscles then RLS symptoms reveal themselves there. *BDBT9* is expressed in liver and influences the level of ferritin and iron storages in organism. When the gene does not function normally then this distracts the homeostasis of iron and iron level in serum goes low. As iron is an important co-factor of tyrosine-hydroxylase in the synthesis of dopamine then the level of dopamine goes down and this results in periodic limb movements (PLM). As it was said before then the role of *TOX3* concerning RLS is still under investigation but GWAS has found SNP rs6747972 that locates in intron, so we can assume that the role of *TOX3* is regulatory.

Although genetic investigations have yet not found the causal gene of RLS then clinically the situation seems a little clearer. There are medications that can cause RLS and there are those with what one can treat RLS. It is possible to diagnose RLS with polysomnography or actigraphy and when there is need then a doctor can prescribe medications. The bottleneck here seems to be that doctors in general are too little informed about RLS.

As I said before then I have talked in my work about the results of linkage analyses and GWASs but for now there has not been found 100% causal gene for RLS. In spite of that the further investigations with these SNPs and RLS regions that have already been associated with RLS can hopefully give us in the future one mutation that causes RLS. This kind of discovery would be very beneficial in future prospective. It could be possible to identify from patient's DNA if he/she has this mutation in his/her genome. When the patient has it and has the symptoms of RLS also then the doctor can prescribe RLS medications and cure RLS. But when the patient does not have this mutation and has the symptoms of RLS then there can be possibility that he/she has secondary RLS and the real cause of RLS symptoms lie in some other disease that need to be cured. It is possible that in the future sequencing becomes so available that it will become a method to scan the genes that cause diseases.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Alander, T., Andén, N.E. & Grabowska-Andén, M. (1980). Metoclopramide and sulpiride as selective blocking agents of pre- and postsynaptic dopamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 312: 145–150.
- Allen, R.P., Barker, P.B., Horská, A. & Earley, C.J. (2013). Thalamic glutamate/glutamine in restless legs syndrome: increased and related to disturbed sleep. *Neurology* 80(22): 2028–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624560>
- Allen, R.P. & Earley, C.J. (2007). The role of iron in restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22 Suppl 1: S440–S448.
- Allen, R.P., Mignot, E., Ripley, B., Nishino, S. & Earley, C.J. (2002). Increased CSF hypocretin-1 (orexin-A) in restless legs syndrome. *Neurology* (Vol. 59).
- Allen, R.P., Walters, A.S., Montplaisir, J., Hening, W., Myers, A., Bell, T.J. & Ferini-Strambi, L. (2005). Restless legs syndrome prevalence and impact: REST general population study. *Archives of Internal Medicine* 165(11): 1286–1292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956009>
- Allen, R.P., Picchietti, D., Hening, W.A., Trenkwalder, C., Walters, A.S., Montplaisi, J., ... Zucconi, M. (2003). Restless legs syndrome: Diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Medicine* 4: 101–119.
- Arndt, S., Poser, I., Moser, M. & Bosserhoff, A.K. (2007). Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34: 603–611.
- Azpiazu, N. & Morata, G. (2002). Distinct functions of homothorax in leg development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 119: 55–67.
- Bara-Jimenez, W., Aksu, M., Graham, B., Sato, S. & Hallett, M. (2000). Periodic limb movements in sleep: state-dependent excitability of the spinal flexor reflex. *Neurology* 54: 1609–1616.
- Billiard, M. (2003a). POLYSOMNOGRAPHY: Technique. In M. Billiard (ed.), *Sleep: Physiology, investigations and medicine* (2nd ed.). New York: Kluwer and Plenum.
- Billiard, M. (2003b). Treatment. In M. Billiard (ed.), *Sleep: Physiology, investigations and medicine* (2nd ed.). New York: Kluwer and Plenum.
- Billiard, M. (2003c). PATOPHYSIOLOGY. In M. Billiard (ed.), *Sleep: Physiology, Investigations and Medicine* (2nd ed.). New York: Kluwer and Plenum.

- Bonati, M.T., Ferini-Strambi, L., Aridon, P., Oldani, A., Zucconi, M. & Casari, G. (2003). Autosomal dominant restless legs syndrome maps on chromosome 14q. *Brain* 126: 1485–1492.
- Bucher, S.F., Seelos, K.C., Oertel, W.H., Reiser, M. & Trenkwalder, C. (1997). Cerebral generators involved in the pathogenesis of the restless legs syndrome. *Annals of neurology* 41: 639–645.
- Budhiraja, P., Budhiraja, R., Goodwin, J.L., Allen, R.P., Newman, A.B., Koo, B.B. & Quan, S.F. (2012). Incidence of restless legs syndrome and its correlates. *Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine* 8(2): 119–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3311406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cavanaugh, J.E., Jaumotte, J.D., Lakoski, J.M and Zigmond, M.. (2006). Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress. *Journal of neuroscience research* 84: 1367–75.
- Cervenka, S., Pålhagen, S.E., Comley, R.A., Panagiotidis, G., Cselényi, Z., Matthews, J.C., ... Farde, L. (2006). Support for dopaminergic hypoactivity in restless legs syndrome: a PET study on D2-receptor binding. *Brain : a journal of neurology* 129(Pt 8): 2017–2028.
- Chen, S., Ondo, W.G., Rao, S., Li, L., Chen, Q. & Wang, Q. (2004). Genomewide linkage scan identifies a novel susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 9p. *American journal of human genetics* 74: 876–885.
- Clardy and Connor. (2009). Restless Leg Syndrome. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Pennsylvania State.
- Collado-Seidel, V., Kohnen, R., Samtleben, W., Hillebrand, G.F., Oertel, W.H. & Trenkwalder, C. (1998). Clinical and biochemical findings in uremic patients with and without restless legs syndrome. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 31(2): 324–328.
- Connor, J.R. (2008). Pathophysiology of restless legs syndrome: evidence for iron involvement. *Current neurology and neuroscience reports* 8(2): 162–166.
- Connor, J.R., Boyer, P.J., Menzies, S.L., Dellinger, B., Allen, R.P., Ondo, W.G. & Earley, C.J. (2003). Neuropathological examination suggests impaired brain iron acquisition in restless legs syndrome. *Neurology* 61: 304–309.
- Connor, J.R., Wang, X.-S., Allen, R.P., Beard, J.L., Wiesinger, J.A., Felt, B.T. & Earley, C.J. (2009). Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. *Brain : a journal of neurology* 132(Pt 9): 2403–2412.

- Cowper-Sal·lari, R., Zhang, X., Wright, J.B., Bailey, S.D., Cole, M.D., Eeckhoutte, J., ... Lupien, M. (2012). Breast cancer risk-associated SNPs modulate the affinity of chromatin for FOXA1 and alter gene expression. *Nature Genetics*.
- Curran, S.P. & Ruvkun, G. (2007). Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability. *PLoS Genetics* 3(4): 0479–0487.
- Dasen, J.S., Tice, B.C., Brenner-Morton, S. & Jessell, T.M. (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* 123(3): 477–491.
- Dauvilliers, Y. & Winkelmann, J. (2013). Restless legs syndrome: update on pathogenesis. *Current opinion in pulmonary medicine* 19(6): 594–600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048084>
- DeAndrade, M.P., Johnson, R.L Jr., Unger, E.L., et al. (2012). Motor restlessness, sleep disturbances, thermal sensory alterations and elevated serum iron level in BTBD9 mutant mice. *Human molecular genetics* 21: 3984–92.
- Desai, A.V., Cherkas, L. F., Spector, T.T., William, A.J. (2004). Genetic influences in self-reported symptoms of obstructive sleep apnoea and restless legs: a twin study. *Twin Res* 7: 589–595.
- Desautels, A., Turecki, G., Montplaisir, J., Sequeira, A., Verner, A. & Rouleau, G.A. (2001). Identification of a major susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 12q. *American journal of human genetics* 69: 1266–1270.
- Dinev, D., Jordan, B.W., Neufeld, B., Lee, J.D., Lindemann, D., Rapp, U.R. & Ludwig, S. (2001). Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO reports* 2(9): 829–834.
- Dittmer, S., Kovacs, Z., Yuan, S.H., Siszler, G., Kögl, M., Summer, H., ... Methner, A. (2011). TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex. *Journal of cell science* 124(Pt 2): 252–260.
- Earley, C.J. (2003). Restless Legs Syndrome. *New England Journal of Medicine* 348: 2103–2109.
- Earley, C.J., Connor, J.R., Beard, J.L., Malecki, E.A., Epstein, D.K. & Allen, R.P. (2000). Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. *Neurology* (Vol. 54).
- Earley, C.J., Heckler, D. & Allen, R.P. (2005). Repeated IV doses of iron provides effective supplemental treatment of restless legs syndrome. *Sleep Medicine* 6: 301–305.
- Earley, C.J. & Silber, M.H. (2010). Restless legs syndrome: Understanding its consequences and the need for better treatment. *Sleep Medicine*.

- Ekbom, K.A. (1945). Restless legs. *Acta Med Scand* 158: 1–123.
- Ekbom, K.A. (1960). No Title Restless legs syndrome. *Neurology* 10: 868–873.
- Facheris, M.F., Hicks, A.A., Pramstaller, P.P., Pichler, I. (2010). Update on the management of restless legs syndrome: existing and emerging treatment options. *Nature and Science of Sleep*.
- Fedorow, H., Tribl, F., Halliday, G., Gerlach, M., Riederer, P. & Double, K.L. (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*.
- Ferini-Strambi, L. (2002). Restless legs syndrome augmentation and pramipexole treatment. *Sleep Medicine* 3(SUPPL. 1).
- Freeman, A., Pranski, E., Miller, R.D., Radmard, S., Bernhard, D., Jinnah, H. a, ... Sanyal, S. (2012). Sleep fragmentation and motor restlessness in a *Drosophila* model of Restless Legs Syndrome. *Current biology: CB* 22(12): 1142–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3381864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Freeman, A.H. and & Rye, D.B. (2013). The molecular basis of restless legs syndrome. *Current opinion in neurobiology* 23(5): 895–900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896312>
- Garcia-Borreguero, D., Odin, P. and Serrano, C. (2003). Restless legs syndrome and PD: a review of the evidence for a possible association. *Neurology* 61: 49–55.
- Geyer, J.D ; Payne, T. A ja Carney, P.R. (2010). *Atlas of Polysomnography*. In *Atlas of Polysomnography* (2nd ed.). Philadelphia, USA: Lippincott and Williams.
- Godau, J., Schweitzer, K.J., Liepelt, I., Gerloff, C. & Berg, D. (2007). Substantia nigra hypoechogenicity: definition and findings in restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22: 187–192.
- Grote, L., Leissner, L., Hedner, J. & Ulfberg, J. (2009). A randomized, double-blind, placebo controlled, multi-center study of intravenous iron sucrose and placebo in the treatment of restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24: 1445–1452.
- Gschliesser, V., Frauscher, B., Brandauer, E., Kohnen, R., Ulmer, H., Poewe, W. & H??gl, B. (2009). PLM detection by actigraphy compared to polysomnography: A validation and comparison of two actigraphs. *Sleep Medicine* 10: 306–311.
- Harris, D.C., Chapman, J.R., Stewart, J.H., Lawrence, S. & Roger, S.D. (1991). Low dose erythropoietin in maintenance haemodialysis: improvement in quality of life and reduction in true cost of haemodialysis. *Australian and New Zealand journal of medicine* 21(5): 693–700.

- Hashimoto, Y., Muramatsu, K., Kunii, M., Yoshimura, S. -i., Yamada, M., Sato, T., ... Harada, A. (2012). Uncovering genes required for neuronal morphology by morphology-based gene trap screening with a revertible retrovirus vector. *The FASEB Journal*.
- Hattan, E., Chalk, C. & Postuma, R.B. (2009). Is there a higher risk of restless legs syndrome in peripheral neuropathy? *Neurology* 72(11): 955–960.
- Heckman, C.J., Mottram, C., Quinlan, K., Theiss, R. & Schuster, J. (2009). Motoneuron excitability: The importance of neuromodulatory inputs. *Clinical Neurophysiology*.
- Hening, W.A., Allen, R.P., Earley, C.J., Picchietti, D.L. & Silber, M.H. (2004). An update on the dopaminergic treatment of restless legs syndrome and periodic limb movement disorder. *Sleep* 27(3): 560–583.
- Jellen, L.C., Unger, E.L., Lu, L., Williams, R.W., Rousseau, S., Wang, X., ... Jones, B.C. (2012). Systems genetic analysis of the effects of iron deficiency in mouse brain. *neurogenetics*.
- Jhoo, J.H., Yoon, I.-Y., Kim, Y.K., Chung, S., Kim, J.-M., Lee, S.B., ... Kim, K.W. (2010). Availability of brain serotonin transporters in patients with restless legs syndrome. *Neurology* 74(6): 513–518.
- Jiménez-jiménez, F.J., Alonso-navarro, H., García-martín, E. & Agúndez, J.A.G. (2013). Latest Perspectives in Genetic Risk Factors for Restless Legs Syndrome. *European Neurological Review* 8: 90–96.
- Kemlink, D., Plazzi, G., Vetrugno, R., Provini, F., Polo, O., Stiasny-Kolster, K., ... Montagna, P. (2008). Suggestive evidence for linkage for restless legs syndrome on chromosome 19p13. *Neurogenetics* 9: 75–82.
- Kemlink, D., Polo, O., Montagna, P., Provini, F., Stiasny-Kolster, K., Oertel, W., ... Winkelmann, J. (2007). Family-based association study of the restless legs syndrome loci 2 and 3 in a European population. *Mov Disord* 22: 207–212. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17133505
- Koo, B.B. (2012). Restless legs syndrome: relationship between prevalence and latitude. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* 16(4): 1237–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210354>
- Kurant, E., Pai, C.Y., Sharf, R., et al. (1998). Dorsotonals/homothorax, the *Drosophila* homologue of MEIS1, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development* 125: 1037–1048.
- Lavoie, S. & Drew, T. (2002). Discharge characteristics of neurons in the red nucleus during voluntary gait modifications: a comparison with the motor cortex. *Journal of neurophysiology* 88: 1791–1814.

- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N. et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168–176.
- Levchenko, A., Montplaisir, J.-Y., Asselin, G., Provost, S., Girard, S.L., Xiong, L., ... Rouleau, G.A. (2009). Autosomal-dominant locus for Restless Legs Syndrome in French-Canadians on chromosome 16p12.1. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24: 40–50.
- Levchenko, A., Montplaisir, J.-Y., Dubé, M.-P., Riviere, J.-B., St-Onge, J., Turecki, G., ... Rouleau, G.A. (2004). The 14q restless legs syndrome locus in the French Canadian population. *Annals of neurology* 55: 887–891.
- Levchenko, A., Provost, S., Montplaisir, J.Y., Xiong, L., St-Onge, J., Thibodeau, P., ... Rouleau, G.A. (2006). A novel autosomal dominant restless legs syndrome locus maps to chromosome 20p13. *Neurology* 67: 900–901.
- Levin, L.I., Munger, K.L., O'Reilly, E.J., Falk, K.I. & Ascherio, A. (2010). Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 67: 824–830.
- Li, Y., Munger, K. L., Batool-Anwar, S., De Vito, K., Ascherio, A., Gao. (2012). Association of multiple sclerosis with restless legs syndrome and other sleep disorders in women. *Neurology* 78(19): 1500–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3345617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lohmann-Hedrich, K., Neumann, a, Kleensang, a, Lohnau, T., Muhle, H., Djarmati, a, ... Klein, C. (2008). Evidence for linkage of restless legs syndrome to chromosome 9p: are there two distinct loci? *Neurology* 70(9): 686–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032746>
- Manconi, M., Govoni, V., De Vito, A., Economou, N.T., Cesnik, E., Casetta, I., ... Granieri, E. (2004). Restless legs syndrome and pregnancy. *Neurology* 63(6): 1065–1069.
- Martin, J.H. (1996). *Neuroanatomy: Text and Atlas* (2nd ed.).
- Mathias, R.A., Hening, W., Washburn, M., Allen, R.P., Lesage, S., Wilson, A.F. & Earley, C.J. (2006). Segregation analysis of restless legs syndrome: Possible evidence for a major gene in a family study using blinded diagnoses. *Human Heredity* 62: 157–164.
- McNab, F., Varrone, A., Farde, L., Jucaite, A., Bystritsky, P., Forssberg, H. & Klingberg, T. (2009). Changes in cortical dopamine D1 receptor binding associated with cognitive training. *Science (New York, N.Y.)* 323(5915): 800–802.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martínez, C. & Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402: 425–429.

- Merlino, G., Fratticci, L., Valente, M., Del Giudice, A., Noacco, C., Dolso, P., ... Gigli, G.L. (2007). Association of restless legs syndrome in type 2 diabetes: a case-control study. *Sleep* 30(7): 866–871.
- Mignot, E. (2007). A step forward for restless legs syndrome. *Nat Genet* 39(8): 938–9.
- Mizuhara, E., Nakatani, T., Minaki, Y., Sakamoto, Y. & Ono, Y. (2005). Corl1, a novel neuronal lineage-specific transcriptional corepressor for the homeodomain transcription factor Lbx1. *The Journal of biological chemistry* 280(5): 3645–3655.
- Mitler, M.M., Browman, C.P., Menn, S.J., Gujavarty, K. & Timms, R.M. (1986). Nocturnal myoclonus: treatment efficacy of clonazepam and temazepam. *Sleep* (Vol. 9).
- Moens, C.B. & Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental Biology*.
- Monte-Silva, K., Kuo, M.-F., Thirugnanasambandam, N., Liebetanz, D., Paulus, W. & Nitsche, M.A. (2009). Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(19): 6124–6131.
- Montplaisir, J., Boucher, S., Poirier, G., Lavigne, G., Lapierre, O. & Lespérance, P. (1997). Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 12(1): 61–65.
- Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I.O. & Buchberg, A.M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Molecular and cellular biology* 15(10): 5434–5443.
- Murray, T.J. (1967). The restless leg syndrome. *Canadian Medical Association journal* 96(24): 1571–1574.
- Müller-Felber, W., Landgraf, R., Wagner, S., Mair, N., Nusser, J., Landgraf-Leurs, M.M., ... Land, W. (1991). Follow-up study of sensory-motor polyneuropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects after simultaneous pancreas and kidney transplantation and after graft rejection. *Diabetologia* 34 Suppl 1: S113–S117.
- Naciff, J.M., Overmann, G.J., Torontali, S.M., Carr, G.J., Tiesman, J.P., Richardson, B.D. & Daston, G.P. (2003). Gene expression profile induced by 17 alpha-ethynyl estradiol in the prepubertal female reproductive system of the rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 72(2): 314–330.
- Nitsche, M.A., Kuo, M.F., Karrasch, R., W??chter, B., Liebetanz, D. & Paulus, W. (2009). Serotonin Affects Transcranial Direct Current-Induced Neuroplasticity in Humans. *Biological Psychiatry* 66(5): 503–508.

- Norman, J.E., Kurtzke, J.F. & Beebe, G.W. (1983). Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 2. Latitude, climate and the risk of multiple sclerosis. *Journal of chronic diseases* 36: 551–559.
- Oppenheim, H. (1923). *Lehrbuch der Nervenkrankheiten*. (7th ed.). Berlin: Karger, S.
- Paalzow, G.H. (1992). L-dopa induces opposing effects on pain in intact rats: (-)-sulpiride, SCH 23390 or alpha-methyl-DL-p-tyrosine methylester hydrochloride reveals profound hyperalgesia in large antinociceptive doses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 263(2): 470–479.
- Paulus, W. & Trenkwalder, C. (2006). Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. *Lancet Neurology* 5(10): 878–886.
- Pereira, J.C., Pradella-Hallinan, M. & Lins Pessoa, H. de. (2010). Imbalance between thyroid hormones and the dopaminergic system might be central to the pathophysiology of restless legs syndrome: a hypothesis. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 65(5): 548–554.
- Pichler, I., Marroni, F., Volpato, C.B., Gusella, J.F., Klein, C., Casari, G., ... Pramstaller, P.P. (2006). Linkage analysis identifies a novel locus for restless legs syndrome on chromosome 2q in a South Tyrolean population isolate. *American journal of human genetics* 79: 716–723.
- Pollmächer, T. & Schulz, H. (1993). Periodic leg movements (PLM): their relationship to sleep stages. *Sleep* 16: 572–577.
- Rijsman, R.M. & De Weerd, A.W. (1999). Secondary periodic limb movement disorder and restless legs syndrome. *Sleep Medicine Reviews*.
- Rye, D.B. & Trotti, L.M. (2012). Restless Legs Syndrome and Periodic Leg Movements of Sleep. *Neurologic Clinics*.
- Sas, A.M.G., Di Fonzo, A., Bakker, S.L.M., Simons, E.J., Oostra, B.A., Maat-Kievit, A.J., ... Bonifati, V. (2010). Autosomal dominant restless legs syndrome maps to chromosome 20p13 (RLS-5) in a Dutch kindred. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 25: 1715–1722.
- Schattschneider, J., Bode, A., Wasner, G., Binder, A., Deuschl, G. & Baron, R. (2004). Idiopathic restless legs syndrome: abnormalities in central somatosensory processing. *Journal of neurology* 251(8): 977–982.
- Schlesinger, I., Eriq, I., Avizohar, O., Sprecher, E., Yarnitsky, D. (2009). Cardiovascular risk factors in restless legs syndrome. *Mov Disord* 24: 1587–92.

- Schormair, B., Kemlink, D., Roeske, D., Eckstein, G., Xiong, L., Lichtner, P., ... Winkelmann, J. (2008). PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome. *Nature genetics* 40: 946–948.
- Schulte, E. C., Winkelmann, J.. (2014). Family and genome-wide association studies of restless legs syndrome. In M. Shaw, P., Tafi, M., Thorpy (ed.), *The Genetic Basis of Sleep and Sleep Disorders*. Cambridge University Press.
- Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J. & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11): 4376–4380.
- Silber, M.H., Ehrenberg, B.L., Allen, R.P., Buchfuhrer, M.J., Earley, C.J., Hening, W.A. & Rye, D.B. (2004). An algorithm for the management of restless legs syndrome. *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Clinic.
- Skehan, E.B., Abdulrahim, M.M.A., Parfrey, N.A. & Hand, C.K. (2012). A novel locus for restless legs syndrome maps to chromosome 19p in an Irish pedigree. *neurogenetics*.
- Skidmore, F.M., Drago, V., Foster, P.S. & Heilman, K.M. Bilateral restless legs affecting a phantom limb, treated with dopamine agonists. , 80 *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 569–570 (2009).
- Spieker, N., van Sluis, P., Beitsma, M., Boon, K., van Schaik, B.D., van Kampen, A.H., ... Versteeg, R. (2001). The MEIS1 oncogene is highly expressed in neuroblastoma and amplified in cell line IMR32. *Genomics* 71(2): 214–221.
- Stefansson, H., Rye, D.B., Hicks, A., Petursson, H., Ingason, A., Thorgeirsson, T.E., ... Stefansson, K. (2007). A genetic risk factor for periodic limb movements in sleep. *The New England journal of medicine* 357(7): 639–647.
- Stefansson, H, Rye DB, Hicks A, Petursson H, Ingason A, Thorgeirsson TE, Palsson S, Sigmundsson T, Sigurdsson AP, Eiriksdottir I, Soebach E, Bliwise D, Beck JM, Rosen A, Waddy S, Trotti LM, Iranzo A, Thambisetty M, Hardarson GA, Kristjansson K, Gudmundsson, S.K. (2007). A genetic risk factor for periodic limb movements in sleep. *New England Journal of Medicine* 357: 639–647.
- Stiasny-Kolster, K., Magerl, W., Oertel, W.H., Möller, J.C. & Treede, R.-D. (2004). Static mechanical hyperalgesia without dynamic tactile allodynia in patients with restless legs syndrome. *Brain : a journal of neurology* 127(Pt 4): 773–782.
- Sun, Y.-M.J., Hoang, T., Neubauer, J. a & Walters, A.S. (2011). Opioids protect against substantia nigra cell degeneration under conditions of iron deprivation: a mechanism of possible relevance to the Restless Legs Syndrome (RLS) and Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 304(1-2): 93–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376342>

- Zhao, H., Zhu, W., Pan, T., Xie, W., Zhang, A., Ondo, W.G. & Le, W. (2007). Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *Journal of neuroscience research* 85(5): 1065–1076.
- Zimprich, A. (2012). Phenocopies in families with essential tremor and restless legs syndrome challenge Mendelian laws. Epigenetics might provide answers. *Parkinsonism and Related Disorders*.
- Trenkwalder, C., Hening, W.A., Montagna, P., Oertel, W.H., Allen, R.P., Walters, A.S., ... Sampaio, C. (2008). Treatment of restless legs syndrome: an evidence-based review and implications for clinical practice. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23: 2267–2302.
- Trenkwalder, C. & Paulus, W. (2004). Why do restless legs occur at rest? - Pathophysiology of neuronal structures in RLS. *Neurophysiology of RLS (part 2). Clinical Neurophysiology*.
- Trenkwalder, C. & Paulus, W. (2010). Restless legs syndrome: pathophysiology, clinical presentation and management. *Nature reviews. Neurology* 6(6): 337–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20531433>
- Turjanski, N., Lees, A.J. and Brooks, D.J. (1999). Striatal dopaminergic function in restless legs syndrome: F-dopa and C-raclopride PET studies. *Neurology* 52: 932–937.
- Uetani, N., Chagnon, M.J., Kennedy, T.E., Iwakura, Y. & Tremblay, M.L. (2006). Mammalian motoneuron axon targeting requires receptor protein tyrosine phosphatases sigma and delta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(22): 5872–5880.
- Walters, A.S., Hickey, K., Maltzman, J., Verrico, T., Joseph, D., Hening, W., ... Chokroverty, S. (1996). A questionnaire study of 138 patients with restless legs syndrome: the “Night-Walkers” survey. *Neurology* 46: 92–95.
- Walters, A.S. & Rye, D.B. (2009). Review of the relationship of restless legs syndrome and periodic limb movements in sleep to hypertension, heart disease, and stroke. *Sleep* 32(5): 589–597.
- Ward, K.L., Tkac, I., Jing, Y., Felt, B., Beard, J., Connor, J., ... Rao, R. (2007). Gestational and lactational iron deficiency alters the developing striatal metabolome and associated behaviors in young rats. *The Journal of nutrition* 137: 1043–1049.
- Weissbach, A., Siegesmund, K., Brüggemann, N., Schmidt, A., Kasten, M., Pichler, I., ... Lohmann, K. (2012). Exome sequencing in a family with restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27(13): 1686–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192925>
- Willis, T. (1672). *De Animae Brutorum*. London: Wells and Scott.

- Winkelman, J.W., Sethi, K.D., Kushida, C.A., Becker, P.M., Koester, J., Cappola, J.J. & Reess, J. (2006). Efficacy and safety of pramipexole in restless legs syndrome. *Neurology* 67(6): 1034–1039.
- Winkelmann, J., Czamara, D., Schormair, B., Knauf, F., Schulte, E.C., Trenkwalder, C., ... Meitinger, T. (2011). Genome-Wide association study identifies novel restless legs syndrome susceptibility loci on 2p14 and 16q12.1. *PLoS Genetics* 7(7).
- Winkelmann, J., Lichtner, P., Schormair, B., Uhr, M., Hauk, S., Stiasny-Kolster, K., ... Müller-Myhsok, B. (2008). Variants in the neuronal nitric oxide synthase (nNOS, NOS1) gene are associated with restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23: 350–358.
- Winkelmann, J., Muller-Myhsok, B., Wittchen, H.-U., Hock, B., Prager, M., Pfister, H., ... Trenkwalder, C. (2002). Complex segregation analysis of restless legs syndrome provides evidence for an autosomal dominant mode of inheritance in early age at onset families. *Annals of neurology* 52: 297–302.
- Winkelmann, J., Schormair, B., Lichtner, P., Ripke, S., Xiong, L., Jalilzadeh, S., ... Meitinger, T. (2007). Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions. *Nature genetics* 39: 1000–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17637780>
- Vogl, F.D., Pichler, I., Adel, S., Pinggera, G.K., Bracco, S., De Grandi, A., ... Pramstaller, P.P. (2006). Restless legs syndrome: epidemiological and clinicogenetic study in a South Tyrolean population isolate. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21: 1189–1195.
- Xiong, L., Catoire, H., Dion, P., Gaspar, C., Lafrenière, R.G., Girard, S.L., ... Rouleau, G.A. (2009). MEIS1 intronic risk haplotype associated with restless legs syndrome affects its mRNA and protein expression levels. *Human molecular genetics* 18(6): 1065–1074.
- Xiong, L., Montplaisir, J., Desautels, A., Barhdadi, A., Turecki, A., Levchenko, A., Thibodeau, P., Dube, M., Gaspar, C., Rouleau, A. (2010). Family Study of Restless Legs Syndrome in Quebec, Canada. *Arch Neurol* 67: 617–622. Retrieved from http://archpedi.jamanetwork.com/data/Journals/NEUR/7787/noc90097_617_622.pdf
- Yang, Q., Li, L., Chen, Q., Foldvary-Schaefer, N., Ondo, W.G. & Wang, Q.K. (2011). Association studies of variants in MEIS1, BTBD9, and MAP2K5/SKOR1 with restless legs syndrome in a US population. *Sleep Medicine* 12: 800–804.
- Yang, Q., Li, L., Yang, R., Shen, G.-Q., Chen, Q., Foldvary-Schaefer, N., ... Wang, Q.K. (2011). Family-based and population-based association studies validate PTPRD as a risk factor for restless legs syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26: 516–519.

Yuan, S.H., Qiu, Z. and Gosh, A. (2009). TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 2909–2914.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. International Restless Legs Study Group kodulehekülg
<http://irlssg.org/diagnostic-criteria/> Viimati vaadatud 17.04.2014
2. Sleep Disorders - About.com kodulehekülg.
<http://sleepdisorders.about.com/od/sleepdisorderevaluation/a/What-Is-Actigraphy.htm>
Viimati vaadatud 02.05.2014
3. Sleep Disorders - About.com kodulehekülg
http://sleepdisorders.about.com/od/causesofsleepdisorder1/ss/RLS_Secondary_Causes_3.htm
Viimati vaadatud 12.02.2014
4. National Institute of Neurological Disorders and Stroke
http://www.ninds.nih.gov/disorders/restless_legs/detail_restless_legs.htm#261793237
Viimati vaadatud 25.04.2014
5. Netdoctor kodulehekülg <http://www.netdoctor.co.uk/brain-and-nervous-system/medicines/seroquel.html> Viimati vaadatud 25.04.2014
6. Right Diagnosis from healthgrade kodulehekülg
http://www.rightdiagnosis.com/symptoms/restless_leg_syndrome/common.htm
Viimati vaadatud 25.04.2014
7. NCBI kodulehekülg
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114781>
Viimati vaadatud 25.05.2014
8. NCBI kodulehekülg
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4211>
Viimati vaadatud 25.05.2014
9. NCBI kodulehekülg
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5789>
Viimati vaadatud 25.05.2014

10. NCBI kodulehekül

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/390598>

Viimati vaadatud 25.05.2014

11. NCBI kodulehekül

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5607>

Viimati vaadatud 25.05.2014

12. NCBI kodulehekül

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27324>

Viimati vaadatud 25.05.2014

13. Benbest kodulehekül

<http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd10.html>

Viimati vaadatud 20.05.2014

LISAD

Lisa 1.

RLS-iga seotud geenide funktsioon ja ekspressioon (Mignot, 2007, muudetud)

Geen	Funktsioon arengus	Neurobioloogia	Ekspressioon mujal	Arvatavad RLS-iga seotud sümptomid
<i>MEIS1</i>	Proksimaal-distaalse jäsemetelje areng, neuronaalne diferentseerumine ja tagaaju arenguprotsessid	Ekspreseerub aju mustaines ja punatuumades; võimalik, et reguleerib rauataset nende piirkonade kaudu, mis reguleerivat motoorikat	Perifeerne ekspressioon (kaasa arvatud lihased)	Tahtlikud jäsemete liigutused ja/või perioodilised jäsemete liigutused une ajal
<i>BTBD9</i>	Roll teadmata, perekond, kuhu geen kuulub on kaasatud mitmetesse, kaasa arvatud gastrulatsioon, rakkude diferentseerumine ja jäsemete formeerumine	Ekspreseerub paljudes aju piirkondades	Ekspreseerub maksas; mõjutab ferritiini taset ja raua taset	Peamiselt on RLS-haigetel seotud perioodiliste jäsemete liigutamisega une ajal
<i>MAP2K5</i>	Interakteerub/ aktiveerib MAPK7/ERK5; on kaasatud kasvufaktorite poolt stimuleeritud raku proliferatsiooni ja lihasrakkude diferentseerumis-protsessi	Ekspreseerub paljudes aju piirkondades	Perifeerne ekspressioon (kaasa arvatud lihased ja maks)	
<i>SKOR1</i>	Ekspreseerub keskaju ja tagaaju piiril ning seljaajus; Geeni ekspresseeritakse arengu käigus seljaaju dorsaalse sarve interneuronites	Ekspreseerub selektiivselt ajus ja seljaajus		Sensoorsed sümptomid ja valu tekitamine; ebamugavus-tunne jäsemetes

Tabel GWAS-dest ja teistest uuringutest, mis GWAS-idega minu töös seotud olid.

Kandi- daatgeen	Kro- mo- soom	Uuringu nimetus	Töö autor ja ilmumisaasta	Valimi päritolu	SNP-i kiip	Valimi suurus (RLS- haiged/ Kontroll- grupp	Uuritav SNP	Kromo- soomi piirkond	Riski- alleel	OR (usaldus- vahemik 95%) või Z-skoor	P väärtus (olulisus- tõenäosuse väärtus)
MEIS1	2p14	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs2300478	intron	G	1.74(1.57-1.92)	4,89*10 ⁻¹⁰
		Replikatsiooniuuring	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased		903 / 891	rs2300478	intron	G	1.74(1.57-1.92)	5,93*10 ⁻¹²
		Replikatsiooniuuring	(Winkelmann et al., 2007)	kanadalased		255/287	rs2300478	intron	G	1.74(1.57-1.92)	2.19*10 ⁻³
		Metaanalüüs (1+2a+2b) (korigeeritud Bonferroni testiga)	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs2300478	intron	G	1.74(1.57-1.92)	8.08*10 ⁻²³
		Perekonnapõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		38 perekonda	rs2300478	intron	G	Z-skoor= 1.282	2*10 ⁻² ; α=0,017
		Populatsioonipõhine Assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		150/84 189/560	rs2300478	intron	G	1.65(1.28-2.13)	seost pole 0.0001
		RT-PCR	(Xiong et al., 2009)	europiidid		24/140	rs12469063	intron	G	2.3(1.3-4.1)	0.006
BTBD9	6p21,2	GWAS	(Stefansson et al., 2007)	islandlased	Human Hap300 & Hap300-duo+Bead, Illumina	306/15633	rs3923809	intron	A	1,8(1,5-2,2)	2*10 ⁻⁹
		Replikatsiooniuuring	(Stefansson et al., 2007)	islandlased		123/1233	rs3923809	intron	A	1.8(1,3-2,4)	4*10 ⁻⁴
		Replikatsiooniuuring	(Stefansson et al., 2007)	Ameerika valge rassi populatsioon		188/662	rs3923809	intron	A	1,5(1,2-2,0)	4*10 ⁻³

Lisa 2.
järg

	Populatsioonipõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		189/560	rs9357271	intron	T	1,59(1,18- 2,15)	0.0021
	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs 9296249	intron	T	1,67(1,49- 1,89)	2,19*10 ⁻⁶
	Replikatsiooniuuringud	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased		903 / 891	rs9296249	intron	T	1,67(1,49- 1,89)	1,61*10 ⁻⁶
	Replikatsiooniuuringud	(Winkelmann et al., 2007)	kanadalased		255/287	rs9296249	intron	T	1,67(1,49- 1,89)	4,14*10 ⁻³
	Metaanalüüs (1+2a+2b) korregeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	kanadalased ja sakslased		1969/4466	rs9296249	intron	T	1,67(1,49- 1,89)	9,44*10 ⁻¹³
	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs9357271	intron	T	1,66(1,48- 1,87)	5,48*10 ⁻⁶
	Replikatsiooniuuringud	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased		903 / 891	rs9357271	intron	T	1,66(1,48- 1,87)	1,85*10 ⁻⁶
	Replikatsiooniuuringud	(Winkelmann et al., 2007)	kanadalased		255/287	rs9357271	intron	T	1,66(1,48- 1,87)	2,48*10 ⁻³
	Metaanalüüs (1+2a+2b) korregeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	kanadalased ja sakslased		1969/4466	rs9357271	intron	T	1,66(1,48- 1,87)	1,5*10 ⁻¹²
	Perekonnapõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		38 perekonda 150/84	rs9357271	intron	T	Z skoor= 0.3	0.764 $\alpha=0.017$ Seost ei ole
	Populatsioonipõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		189/560	rs9357271	intron	T	1,59(1,18- 2,15)	0.0021

Lisa 2.
järg

	GWAS Replikatsiooniuuring Metaanalüüs	(Winkelmann et al., 2011)	europiidid	Genome-Wide Human SNP 5.0 Array, Affymetrix (RLS-patsientidele) Genome-Wide Human SNP 6.0 Array, Affymetrix (kontrollgrupi)	GWAS: 922/1526 Metaanalüüs: 3935/5754	rs9357271	intron	T	1.47(1.35-1.47)	$P_{\text{GWAS}} = 6.74 \times 10^{-7}$ $P_{\text{rep}} = 2.01 \times 10^{-16}$ $P_{\text{meta}} = 7.75 \times 10^{-22}$
PTPRD	9p23-p24.3	(Schormair et al., 2008)	sakslased, austerlased, tsehid, kanadalased	500K, Affymetrix (n=401 + 1644) Genome-Wide Human SNP 5.0 Array, Affymetrix (n=227)	2458/4749	rs4626664	intron	A	1.44 (1.31-1.59)	5.91×10^{-10}
	Perekonnapõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Yang, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		15 perekonda 144/560	rs1975197	Intron	T	Z-skoor= 2.437	0.015
	Populatsioonipõhine kontrolluuring	(Yang, Li, Yang, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		189/560	rs1975197	Intron	T	1.68(1.26-2.25)	0.0004
MAP2K/SKOR1	15q23	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs12593813	intron	G	1.50 (1.36-1.66)	1.85×10^{-6}
MAP2K5	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs12593813	intron	G	1.50 (1.36-1.66)	2.51×10^{-10}

Lisa 2.
järg

MAP2K5	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs11635424	Intron	G	1.51 (1.37–1.67)	1.77*10 ⁻⁶
MAP2K5	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs11635424	Intron	G	1.51 (1.37–1.67)	8.64*10 ⁻¹¹
MAP2K5	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs4489954	Intron	G	1.51 (1.36–1.67)	2.44*10 ⁻⁶
MAP2K5	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs4489954	Intron	G	1.51 (1.36–1.67)	6.35*10 ⁻¹⁰
MAP2K5	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs3784709	Intron	C	1.52 (1.37–1.68)	3.56*10 ⁻⁶
MAP2K5	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs3784709	Intron	C	1.52 (1.37–1.68)	9.61*10 ⁻¹¹
MAP2K5	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs1026732	Intron	G	1.53(1.39–1.70)	4.67*10 ⁻⁷
MAP2K5	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs1026732	Intron	G	1.53 (1.39–1.70)	1.44*10 ⁻¹¹
MAP2K5/ SKOR1	GWAS	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased	500K, Affymetrix	401/1644	rs6494696	Intron	G	1.52 (1.38–1.69)	1.79*10 ⁻⁶
MAP2K5/ SKOR1	Metaanalüüs (1+2a+2b) korrigeeritud Bonferroni testiga	(Winkelmann et al., 2007)	sakslased ja kanadalased		1969/4466	rs6494696	Intron	G	1.52 (1.38–1.69)	4.7*10 ⁻¹¹

Lisa 2.
järg

MAP2K5/ SKOR1		GWAS Replikatsiooniuuring Metaanalüüs	(Winkelmann et al., 2011)	europiidid	Genome-Wide Human SNP 5.0 Array, Affymetrix (RLS haigetele) Genome-Wide Human SNP 6.0 Array, Affymetrix (kontrollgruppi)	922 /1526 3935/5754	rs12593813	Intron	G	1.41 (1.32–1.52)	$P_{GWA}=1.49 \times 10^{-6}$ $P_{rep}=1.54 \times 10^{-17}$ $P_{meta}=1.37 \times 10^{-22}$
MAP2K5/ SKOR1		Perekonnapõhine assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		38 perekonda	rs1026732	Intron	G	Z skoor= 2.568	$p=0.01$, $\alpha=0.017$
MAP2K5/ SKOR1		Populatsioonipõhine Assotsiatsiooniuuring	(Yang, Li, Chen, et al., 2011)	Ameerika valge rassi populatsioon		150/84 189/560	rs1026732	Intron	G	1.55(1.19–2.03)	0.0011
TOX3	16q12; 1	GWAS Replikatsiooniuuring Metaanalüüs	(Winkelmann, Czamara, Schormair, Knauf, Schulte, Berger, et al., 2011)	europiidid	Genome-Wide Human SNP 5.0 Array, Affymetrix (RLS haigetele) Genome-Wide Human SNP 6.0 Array, Affymetrix (kontrollgruppi)	922 /1526 3935/5754	rs3104767	Intron	G	1.35(1.27–1.43)	$P_{GWA}=7.38 \times 10^{-7}$ $P_{rep}=2.16 \times 10^{-13}$ $P_{meta}=9.4 \times 10^{-19}$
Intergeenne regioon	2p14	GWAS Replikatsiooniuuring Metaanalüüs	(Winkelmann et al., 2011)	europiidid	Genome-Wide Human SNP 5.0 Array, Affymetrix (RLS haigetele) Genome-Wide Human SNP 6.0 Array, Affymetrix (kontrollgruppi)	922 /1526 3935/5754	rs6747972	Intergeenne	A	1.23(1.16–1.31)	$P_{GWA}=1.37 \times 10^{-6}$ $P_{rep}=3.73 \times 10^{-6}$ $P_{meta}=9.03 \times 10^{-11}$

LIHTLITSENTS

Mina, Marju Bani

Sünnikuupäev (20.06.1986)

- 1 annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
``Rahutute jalgade sündroomi patofüsioloogiast ja geneetilistest aspektidest``,

mille juhendajad on Maris Teder-Laving ja Andres Metspalu
- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014

